

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAMILE LUCIANE REUS

CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO E SÍLICA: EFEITOS
NA LINHAGEM BALB/C 3T3 CLONE A31

CURITIBA

2019

THAMILE LUCIANE REUS

CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO E SÍLICA: EFEITOS
NA LINHAGEM BALB/C 3T3 CLONE A31

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof(a). Dr. Bruno Dallagiovanna

Coorientadora: Prof(a). Dra. Alessandra Melo de Aguiar

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Reus, Thamile Luciane
Citotoxicidade de nanopartículas de bismuto e sílica: efeitos na
linhagem BALB/c 3T3 clone A31. / Thamile Luciane Reus. – Curitiba, 2019.
158 p.: il.

Orientador: Bruno Dallagiovanna
Coorientador: Alessandra Melo de Aguiar

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Nanopartículas 2. Bismuto 3. Dióxido de silício 4. Toxicidade I.
Título II. Dallagiovanna Muñiz, Bruno III. Aguiar, Alessandra Melo de IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 571.95



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40061016007P8

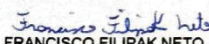
TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **THAMILE LUCIANE REUS** intitulada: **CITOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE BISMUTO E SÍLICA: EFEITOS NA LINHAGEM BALB/c 3T3 CLONE A31**, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.


A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Agosto de 2019.


ALESSANDRA MELO DE AGUIAR
Presidente da Banca Examinadora


FRANCISCO FILIPAK NETO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


DESIRÉE CIGARAN SCHUCK
Avaliador Externo (GRUPO BOTICÁRIO)


GUILHERME FERREIRA SILVEIRA
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)


CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores: Bruno Dallagiovanna e Alessandra Melo de Aguiar, minha eterna gratidão. Por terem depositado a confiança em mim para o desenvolvimento deste trabalho e por sempre terem me ensinado a importância de ser um bom ser humano, além de um bom profissional. Obrigada por todos os conhecimentos ensinados e por terem sido amigos maravilhosos nessa caminhada.

Ao Leonardo, por ter caminhado grande parte desta jornada comigo. Muito obrigada por todo o cuidado, carinho, zelo, amor e preocupação. Muito obrigada por nunca permitir que eu descreditasse dos meus sonhos e de mim mesma. Muito obrigada por ter feito tudo ficar mais leve. Obrigada por cada “Divirta-se!” toda manhã. Obrigada por me fazer sentir segura e com energia e garra para ter chegado até aqui. Obrigada simplesmente por tudo e por ter feito a minha vida melhor a cada dia e pela família que você me deu.

A minha família, por ter me apoiado em minhas decisões e por ter sido meu ponto de apoio e meu alicerce. Por terem me ajudado a começar do zero e por nunca terem descreditado de mim. Muito obrigada por tudo o que vocês fizeram e fazem em prol da nossa família. Sou muito grata por ter nascido nesta família tão maravilhosa!

Aos amigos do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco: Addeli, Ana, Anny, Ariane, Alan, Amanda, Bruna Marcon, Bruna Falavinha, Bernardo, Crisciele, Cintia, Isa, Letícia, MJ, Jhonatam e aos amigos e pesquisadores Alejandro, Marco e Patrícia. Muito obrigada por toda a amizade e a ajuda durante todos esses anos!

Aos meus amigos, por entenderem minha ausência e apoiarem minhas decisões. Um agradecimento especial a Vanessa, amiga e parceira principalmente nesta reta final – ninguém solta a mão de ninguém!

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular da UFPR. Muito obrigada por todos os ensinamentos e a oportunidade de fazer parte deste programa tão renomado. Ao Instituto Carlos Chagas, por ter cedido novamente este local tão maravilhoso para que este trabalho fosse desenvolvido e aos professores Arandi Ginane Bezerra Jr, Mateus Cardoso, Dimas e Thaís Zaia por toda a colaboração e ensinamentos e ao Thiago

Machado e Iris Ribeiro pela síntese das NPs e parceria que permitissem que este trabalho fosse realizado.

As agências de fomento as quais permitiram que este trabalho fosse realizado, especialmente a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior) pela concessão da bolsa.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

RESUMO

As nanopartículas (NPs) consistem em partículas que possuem dimensões variando de 1 a 100 nm, possuindo uma alta reatividade e enorme gama de aplicações tecnológicas. Devido a muitas NPs terem sido avaliadas e empregadas em produtos de interesse biomédico, torna-se necessária a compreensão da interação de NPs com sistemas biológicos. Uma melhor compreensão acerca da toxicidade destas NPs pode ajudar a evitar ou prever efeitos adversos, posto que em muitos casos, modificações na superfície das NPs podem torná-las mais seguras, facilitando sua aplicação biomédica. Modelos *in vitro* podem ser utilizados para predição de toxicidade e estudo dos mecanismos de interação celular. No presente estudo, buscou-se investigar os efeitos causados por diferentes NPs em cultivos de células eucariotas BALB/c 3T3 (células recomendadas por agências regulatórias para avaliação de citotoxicidade). Inicialmente NPs de Ferro (FeNPs), Ouro (AuNPs), Bismuto (BiNPs) e Sílica (SiO₂NPs) foram avaliadas quanto a suas características físico-químicas, heterogeneidade e estabilidade. Em um primeiro momento, as FeNPs e AuNPs foram descontinuadas deste trabalho pois NPs que se apresentam heterogêneas em sua caracterização físico-química ou instáveis precisam ter seus processos produtivos otimizados antes de serem avaliadas quanto a interação com sistemas biológicos. Prosseguiram-se os estudos com as BiNPs e SiO₂NPs. BiNPs demonstraram ser esféricas e heterogêneas em tamanho e foram estabilizadas com adição de proteínas de soro bovino fetal ou albumina. Em relação aos efeitos biológicos sob células 3T3, avaliou-se o efeito de BiNPs sobre a viabilidade celular relativa, para cálculo de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀; desta forma as BiNPs foram preditas como pertencentes a classe GHS 4 de toxicidade. Além disso, demonstrou-se ainda que BiNPs são internalizadas quando na concentração do IC₅₀ e levam a apoptose de células eucarióticas em efeito concentração-dependente, além de alterarem a morfologia celular a nível ultraestrutural induzindo a formação de figuras de mielina, associadas a autofagia e morte celular. Em relação a SiO₂NPs, também avaliou-se a viabilidade celular relativa para fins de cálculo dos valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀. Estas NPs também foram preditas como classe GHS 4 de toxicidade. Ainda, foi demonstrado que SiO₂NPs levam a morte das células por mecanismo de necrose, sendo que mesmo quando endocitadas, não levam a alterações a nível ultraestrutural na maior parte das células. Além disso, SiO₂NPs exercem efeitos horméticos sob as células 3T3, levando a geração de uma curva concentração resposta bifásica. Com esse trabalho conclui-se que as NPs exercem efeitos sobre sistemas biológicos e suas implicações *in vivo* ou em exposições repetidas devem ser avaliadas em estudos futuros para que seu uso seja consolidado de forma segura e eficaz.

Palavras-chave: Nanopartículas. Bismuto. Sílica. Citotoxicidade. 3T3.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) consist of particles with dimensions ranging from 1 to 100 nm, thus giving these particles a high reactivity power and a wide range of technological applications. Because many NPs have been evaluated and used in products of biomedical interest, it is necessary to understand the interaction of NPs with biological systems. A better understanding of the toxicity of these NPs may help to prevent or predict adverse effects, since in many cases, changes in the surface of NPs can make them safer, therefore, facilitating their biomedical application. In vitro models can be used to predict NP toxicity and to study the mechanisms of cellular interaction. In the present study, we sought to investigate the effects caused by different NPs in BALB/c 3T3 eukaryotic cells (cells recommended by regulatory agencies for cytotoxicity assessment). Initially Iron (FeNPs), Gold (AuNPs), Bismuth (BiNPs) and Silica (SiO₂NPs) NPs were evaluated regarding their physicochemical characteristics, heterogeneity and stability. At first, FeNPs and AuNPs were discontinued from this work because they were shown to be heterogeneous in their physicochemical characterization or unstable and they need to have their production processes optimized before being evaluated for interaction with biological systems. Studies with BiNPs and SiO₂NPs were continued. BiNPs were shown to be spherical and heterogeneous in size and were stabilized by addition of fetal bovine serum proteins or albumin. Regarding the biological effects on 3T3 cells, the effect of BiNPs on relative cell viability was evaluated to calculate IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values. BiNPs were predicted as belonging to the GHS 4 class of toxicity. In addition, we showed that BiNPs are internalized when exposed to IC₅₀ concentration and lead to apoptosis of eukaryotic cells in a concentration-dependent effect. Moreover, they alter the cellular morphology at the ultrastructural level, inducing the formation of myelin figures, which are associated with autophagy and cell death. Regarding SiO₂NPs, relative cell viability was also evaluated to calculate IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values. These NPs were also predicted as belonging to GHS 4 class of toxicity. Furthermore, we showed that SiO₂NPs lead to cell death through a necrosis mechanism. When endocytosed, these NPs do not lead to changes at the ultrastructural level in most cells. In addition, SiO₂NPs exert hormetic effects on 3T3 cells, leading to the generation of a biphasic concentration response curve. With this work, we conclude that NPs have effects on biological systems and their *in vivo* implications or repeated exposures should be evaluated in future studies in order to consolidate their use in an effective and safe way.

Keywords: Nanoparticles. Bismuth. Silica. Cytotoxicity. 3T3.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. 1: NPs consistem em partículas que se encontram em uma escala de 1-100 nm. Adaptado de: CHOU et al., 2011.....	18
Figura 1. 2: Nanopartícula e corona proteica. Adaptado de: WOLFRAM, 2015.	20
Figura 1. 3: Representação esquemática de alguns efeitos tóxicos que podem ser induzidos por NPs em difentes níveis, molecular, celular e tecidual. Adaptado de: WOLFRAM, 2015.....	22
Figura 1. 4: Estudos Clínicos com nanopartículas. Número de estudos clínicos registrados no site www.clinicaltrials.gov , total de 371.....	24
Figura 1. 5: Diagrama esquemático demonstrando as aplicações de NPs de ferro (descritas como IONs) na microbiologia, biotecnologia e medicina moderna. Adaptado de: DINALI et al., 2017.....	26
Figura 1. 6. Exemplo esquemático demonstrando os efeitos físicos inerentes às AuNPs, os quais permitem as mais diversas aplicações destas NPs. Adaptado de: ALKILANY & MURPHY, 2010.	28
Figura 1. 7: Representação esquemática de NPs de sílica (SiO ₂ NPs). Adaptado de: MEBERT et al., 2017.	33

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Figura 4. 1: Fluxograma do trabalho: diferentes etapas e avaliações realizadas no presente trabalho. Fonte: O Autor (2019).....	42
---	----

CAPÍTULO I – Nanopartículas de ferro e ouro

Figura 5. 1: Morfologia de três tipos de FeNPs observada através de MET. ...	49
Figura 5. 2: Dispersão de tamanho de três tipos de NPs de ferro observada através do aparelho Nanosight.....	50
Figura 5. 3: Caracterização das NPs de ouro.....	52
Figura 5. 4: Viabilidade celular relativa de células BALB/c 3T3 após o tratamento com NPs de ouro.....	54

CAPÍTULO II – Nanopartículas de bismuto

BiNPs paper - Figure 1: BiNPs synthesized by LASis are round shaped and heterogeneous in size..	66
--	----

BiNPs paper - Figure 2: The cytotoxicity of BiNPs in medium and BSA is not different.	68
BiNPs paper - Figure 3: BiNPs induce cell death in 3T3 cells in a dose-dependent manner..	70
BiNPs paper - Figure 4: BiNPs become cytotoxic once they are internalized by cells..	71
BiNPs paper - Figure S 1: BiNP (in water, culture medium and BSA) concentration assessed by UV-Vis spectroscopy.....	84
BiNPs paper - Figure S 2: BiNP corona observed by acrylamide gel 10%.....	85

CAPÍTULO III – Nanopartículas de sílica

SiO ₂ NPs paper - Figure 1: Characterization data of the SiO ₂ NPs and RBITC-SiO ₂ NPs.....	102
SiO ₂ NPs paper - Figure 2: The cytotoxic effects of SiO ₂ NPs and RBITC-SiO ₂ NPs were not different.	104
SiO ₂ NPs paper - Figure 3: SiO ₂ NPs led to a biphasic dose response (hormesis) in 3T3 cells..	105
SiO ₂ NPs paper - Figure 4: 3T3 cells exposed to SiO ₂ NPs do not present ultrastructure changes in comparison with control cells, but at higher concentration, a few present morphologic features typical of necrosis.....	107
SiO ₂ NPs paper - Figure 5: SiO ₂ NPs induce necrosis in 3T3 cells in a dose-dependent manner..	109
SiO ₂ NPs paper - Figure S 1: SiO ₂ NPs do not induce apoptosis in 3T3 cells..	124

APÊNDICE 1 – Resultados adicionais: SiO₂NPs

Apêndice 1 - Figura 1: SiO ₂ NPs levam a um aumento na viabilidade celular relativa (hormese) em células BALB/c 3T3 apenas na presença de 5% de SBF..	157
Apêndice 1 - Figura 2: SDS causa redução de viabilidade celular relativa em concentrações atóxicas quando em condições com redução de SBF..	158

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. 1: NPs de ferro, ouro, bismuto e sílica e suas principais características, produtos já comercializados no mercado, ensaios clínicos em andamento e possíveis aplicações. 25

Tabela 1. 2: Categorias GHS e seus respectivos valores de DL_{50} 36

CAPÍTULO I – Nanopartículas de ferro e ouro

Tabela 5. 1: Média de tamanho de três tipos de NPs de ferro.. 51

Tabela 5. 2: Avaliação de tamanho de NP de ferro. 52

CAPÍTULO II – Nanopartículas de bismuto

BiNPs paper - Table S 1: IC values, LD_{50} and the predicted GHS class for each experiment for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in medium ($n=7$) and R^2 for each Hill function curve. 86

BiNPs paper - Table S 2: IC values, LD_{50} and the predicted GHS class for each experiment for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in BSA ($n=3$) and R^2 for each Hill function curve.. 87

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AuNPs - Nanopartículas de ouro

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de cultura americana)

BALB/c 3T3 – Linhagem celular de fibroblasto embrionário murino

BiNPs – Nanopartículas de bismuto

BSA – *Bovine serum albumin*

Cat. - Número de catálogo

CO₂ – Gás carbônico ou dióxido de carbono

DAPI – 4', 6'-diamino-2-fenilindol

DL₅₀ - *Lethal dose* 50%

DLS - *Dynamic Light Scattering*

DMEM – *Dulbecco's modified eagle medium*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

D-PBS – *Dulbecco's phosphate buffered saline*

ECCVAM - *European Centre for The Evaluation of Alternative Methods*

FeNPs – Nanopartículas de ferro

GCD - Goethita + cisteína em água destilada

GCM - Goethita + cisteína em água do mar

GHS - *Globally Harmonized System Of Classification And Labelling Of Chemicals*

GP - Goethita pura

IC₂₀ - *Inhibitory concentration* 20%

IC₅₀ - *Inhibitory concentration* 50%

IC₈₀ - *Inhibitory concentration* 80%

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on The Validation of Alternative Methods*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

m-RNA - RNA mensageiro

MTT – [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]

NHK – *Normal human keratinocytes*

NPs - Nanopartículas

OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*

OMS – Organização mundial da saúde

PBS – Tampão salino fosfatado

PI - Iodeto de propídeo

SBF – Soro bovino fetal

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SiO₂NPs – Nanopartículas de sílica

TEM - *Transmission electron microscopy*

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*

VN – Vermelho neutro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
min	- minuto(s)
h	- hora(s)
mg	- miligrama
™	- trademark
µg/mL	- micrograma por mililitro
g/mL	- grama por mililitro
mm ³	- milímetro cúbico
g	- grama
cm ²	- centímetro quadrado
ml	- mililitro
°C	- graus celsius
µm	- micrômetro
mg/mL	- miligrama por mililitro
µl	- microlitro
µg	- micrograma
mM	- milimolar
mV	- milivolts
n	- número de amostras
nm	- nanômetro
rpm	- rotações por minuto
mm	- milímetro
s	- segundo (s)
p	- significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Nanotecnologia e nanopartículas	17
1.2	Interação de Nanopartículas e sistemas biológicos	18
1.3	Nanotoxicologia	21
1.4	Nanopartículas em produtos para saúde	23
1.5	Nanopartículas de ferro	25
1.6	Nanopartículas de ouro	28
1.7	Nanopartículas de bismuto	30
1.8	Nanopartículas de sílica	32
1.9	Avaliação da citotoxicidade através de métodos in vitro	34
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Objetivos Específicos	38
2.2.1	CAPÍTULO I)	38
2.2.2	CAPÍTULO II)	38
2.2.3	CAPÍTULO III)	38
3	JUSTIFICATIVA	40
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	42
5	CAPÍTULO I – Nanopartículas de ferro e ouro	43
5.1.1	METODOLOGIA:	43
5.1.2	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6	CAPÍTULO II – Nanopartículas de bismuto (publicação)	55
6.1.1	HIGHLIGHTS:	56
6.1.2	ABSTRACT	56
6.1.3	INTRODUCTION	57
6.1.4	METHODS	59
6.1.5	RESULTS	65
6.1.6	DISCUSSION	72
6.1.7	Acknowledgements	77
6.1.8	REFERENCES	78
6.1.9	SUPPLEMENTARY MATERIAL	84
7	CAPÍTULO III – Nanopartículas de sílica (publicação)	88
7.1.1	HIGHLIGHTS:	89
7.1.2	ABSTRACT	89
7.1.3	INTRODUCTION	91
7.1.4	METHODS	94
7.1.5	RESULTS	101
7.1.6	DISCUSSION	110
7.1.7	Acknowledgments	116
7.1.8	REFERENCES	117
7.1.9	SUPPLEMENTARY MATERIAL	124
8	DISCUSSÃO GERAL	125
9	CONCLUSÕES	139
10	PERSPECTIVAS	141
11	REFERÊNCIAS	142
12	APÊNDICE 1 – Resultados adicionais: SiO₂NPs	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e nanopartículas

A nanotecnologia consiste em um termo genérico que se refere aos desenvolvimentos tecnológicos na escala nanométrica, incluindo as nanopartículas (NPs) (SAHA, 2009). Esta ciência tem ajudado na melhora e mesmo na revolução de muitos setores tecnológicos e industriais, como tecnologia da informação, ciência do meio ambiente, medicina, segurança de alimentos, transportes, dentre outros. Desta forma, muito tem se estudado acerca da química, física e biotecnologia de novos materiais com propriedades únicas quando em escala nanométrica (MOBASSER & FIROOZI, 2016). A nanotecnologia também pode ser definida como o uso de nanomateriais para benefício humano (SINGH, 2017).

As nanopartículas (NPs) podem ser definidas como partículas com dimensões na faixa de 1 a 100 nanômetros (nm), sendo das mais diversas origens (ELSAESSER & HOWARD, 2012; JU-NAM & LEAD, 2008; OECD, 2010), como NPs metálicas, carbonáceas, baseadas em silício, orgânicas, poliméricas, cerâmicas etc (VANCE et al., 2015). Elas também podem possuir os mais diferentes formatos, como esferas, estrelas, agulhas e demais formas geométricas (KINNEAR et al., 2017). Além disso, NPs podem apresentar em sua superfície diferentes grupamentos químicos, revestimentos e cargas, os quais são fundamentais para as interações biológicas (ALBANESE, TANG & CHAN, 2012) (Figura 1).

Elas possuem propriedades únicas devido a suas características físicas e químicas quando encontradas na nanoescala (SINGH, 2017). Devido às dimensões reduzidas destas partículas, a relação superfície-volume das NPs é maior do que dos materiais em escala não nanométrica, conferindo um aumento na superfície de contato e das áreas de reatividade nos nanomateriais (AZHDARZADEH et al., 2015) (Figura 1.1). Estruturas em nanoescala apresentam propriedades físicas e químicas diferentes quando comparadas ao material de origem em escala *bulk*, e por essa razão possuem diversas outras aplicações diferentes do que o mesmo material em escala não nanométrica (ZHANG, GAO & BAO, 2015). Além de todas as aplicações visadas para este tipo de material, muito tem se esperado do uso destas NPs no campo da

medicina, representando uma das grandes ferramentas promissoras principalmente para *drug-targeting* e *drug-delivery* (PEDERZOLI et al., 2017).

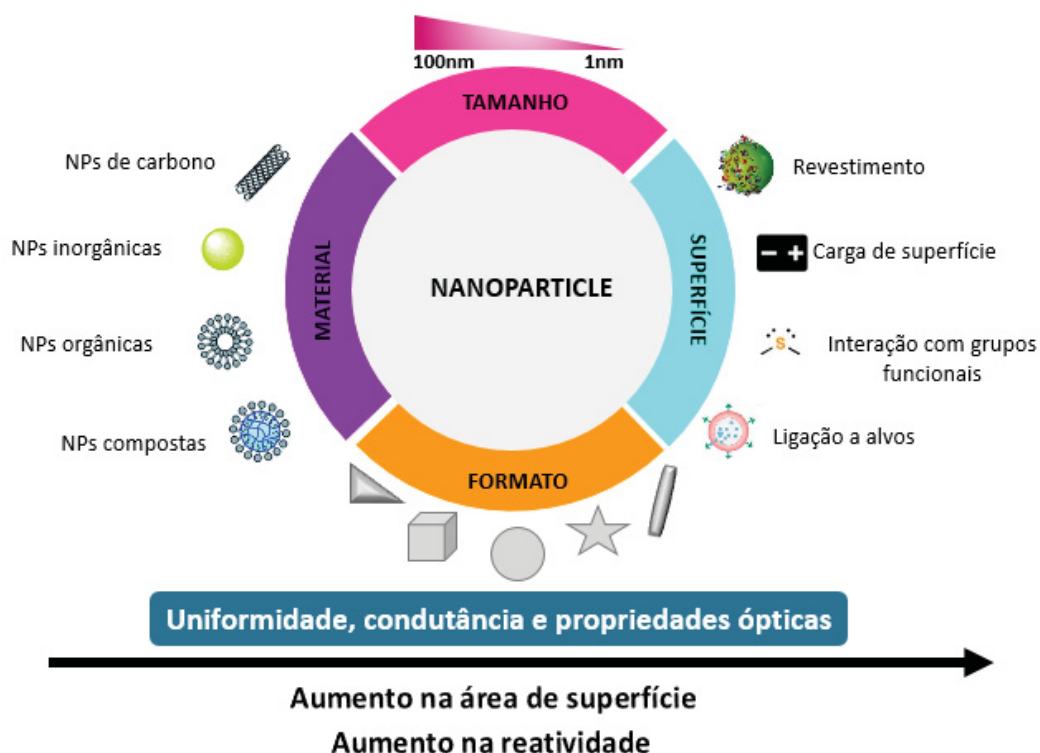


Figura 1. 1: NPs consistem em partículas que se encontram em uma escala de 1-100 nm. Estas partículas podem ser compostas de diferentes materiais de origem, como carbono, materiais orgânicos, inorgânicos ou mesmo materiais compostos, possuindo os mais diferentes formatos. Além disso, elas podem possuir em sua superfície, revestimentos, diferentes cargas e ligantes. Estes materiais ainda podem possuir propriedades físicas como uniformidade, condutância e propriedades ópticas especiais. Quanto menor o tamanho da NP, maior é a área de superfície da NP e consequentemente, maior torna-se a reatividade da mesma. Adaptado de: CHOU et al., 2011.

Para documentar a distribuição e a divulgação de produtos nanométricos, criou-se o Inventário de Produtos de Consumo de Nanotecnologia em 2005. Vance e colaboradores, em 2015, revisitaram muitos destes dados do inventário e pontuaram que: a categoria saúde e *fitness* é a que contém a maior parte dos produtos; prata é o nanomaterial declarado mais utilizado, no entanto, a maioria dos produtos não possui ou não declaram a composição dos nanomateriais utilizados e o contato dérmico é o cenário de exposição mais provável para a maioria dos nanomateriais.

1.2 Interação de Nanopartículas e sistemas biológicos

Antes que a nanotecnologia possa significativamente impactar a medicina, é importante caracterizar o efeito dos nanomateriais em sistemas biológicos. Com o avanço da tecnologia, será imprescindível que sejam elucidadas a fundo como as propriedades físico-químicas das NPs impactam na relação de NPs com organelas subcelulares, células, tecidos e organismos (ALBANESE, TANG & CHAN, 2012).

Já é sabido que diversos fatores, como o tamanho e o formato das NPs, assim como as características de superfície e carga das mesmas afetam a interação NP-célula. O processo de internalização das NPs também pode variar conforme as características físicas das NPs. NPs com ligantes geralmente são internalizadas por endocitose mediada por clatrina; enquanto para NPs aniônicas, o principal mecanismo envolvido é a endocitose mediada por caveolina. Para NPs com tamanho maior, assim como micropartículas, o mecanismo de micropinocitose é o mais encontrado (ADJEI, SHARMA & LABHASETWAR, 2014).

A interação entre NPs inorgânicas e fluídos biológicos (como por exemplo, o plasma) leva a formação de uma corona proteica que permanece ao redor da NP. A corona proteica fornece a identidade biológica que o sistema imune irá detectar. A formação desta corona depende de uma série de fatores, como a composição da NP, seu tamanho, formato, superfície, tempo de exposição, tipo de meio, razão NP/proteína, bem como a presença de íons e outras moléculas que possam interferir na interação entre a NP e as proteínas. Portanto, a presença da corona implica em importantes pontos que determinam a segurança, biocompatibilidade, biodistribuição, toxicidade e uso destas NPs na medicina (BARBERO et al., 2017; PEDERZOLI et al., 2017). A corona proteica consiste em duas camadas delimitadas, denominadas de *hard* corona e *soft* corona, as quais são afetadas pela complexidade do ambiente e do equilíbrio proteína-superfície, principalmente durante a circulação sanguínea *in vivo*. A *hard* corona é formada por proteínas associadas fortemente as NPs, enquanto a *soft* corona consiste na camada externa com proteínas fracamente ligadas (WOLFRAM, 2015) (Figura 1.2).

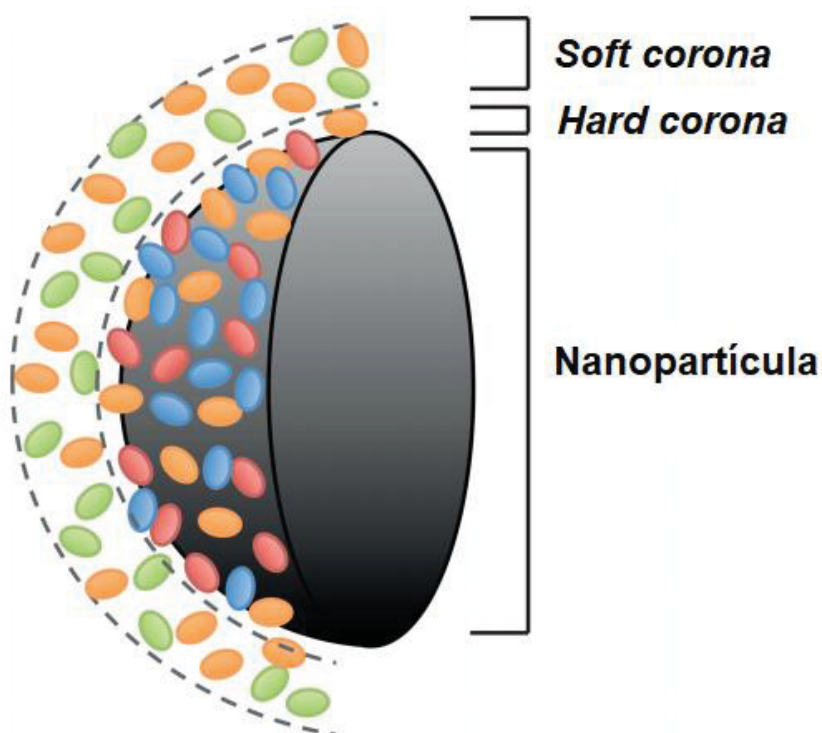


Figura 1. 2: Nanopartícula e corona proteica: Representação de uma nanopartícula e a corona proteica, composta pela soft corona (camada mais externa) e a hard corona (camada mais interna em contato com a nanopartícula). Adaptado de: WOLFRAM, 2015.

A interface célula-NP é altamente heterogênea, gerando forças de diferentes origens que determinam as interações NP-célula. Estas forças são determinadas por uma série de variáveis inerentes às NPs e às células, como: tamanho, formato, rigidez, grupamentos químicos ao redor das NPs, elasticidade da membrana celular, dentre outros. Como o estado celular é altamente dependente do microambiente local, a captação celular de NPs pode não ser apenas específica de acordo com o tipo celular, mas também dependente do estado de saúde do tecido (ZHANG, GAO & BAO, 2015).

Levando em conta que o desenvolvimento de grande parte das NPs tem como finalidade a utilização para fins biomédicos, é fundamental que também se leve em consideração a interação de NPs com o sistema imune. A interação de alguns tipos de NPs com sistemas biológicos pode estimular reações inflamatórias ou alérgicas (NPs de sílica, dióxido de titânio, prata e ouro) ou ativar o sistema complemento (nanotubos de carbono). NPs podem também estimular a resposta imune ao agir como adjuvantes (NPs de hidróxido de alumínio) ou como haptenos (fulereno). Em contrapartida, outros tipos de NPs podem exercer efeitos imunossupressores (NPs de óxido de zinco). Identificar os efeitos das

NPs sob o sistema imune é crucial para o seu uso de forma segura. NPs para aplicações biomédicas podem ser criadas ou mesmo aprimoradas de forma a interagir com o sistema imune ou não. Portanto, para que se possam extrair das NPs apenas os efeitos biológicos desejados, a interação das NPs com o sistema imune deve consistir em uma das principais etapas (KONONENKO, NARAT & DROBNE, 2015).

1.3 Nanotoxicologia

Nanopartículas têm se tornado ferramentas promissoras para as mais diversas aplicações, incluindo diagnóstico e terapia médica (AZHDARZADEH et al., 2015). Contudo, a dimensão dos materiais na escala nanométrica pode também alterar sua interação com os sistemas biológicos, levando a possíveis efeitos adversos. As NPs podem passar através das membranas celulares, o que pode ser responsável pela geração de danos celulares (NATH ROY, GOSWAMI & PAL, 2017). Portanto, é crucial que se entendam as interações entre as NPs e as células a fim de que sejam exploradas as aplicações biomédicas das NPs, especialmente para *drug delivery*. Isto é necessário para que se criem NPs que sejam eficientes, seguras, confiáveis e também não-tóxicas (ADJEI, SHARMA & LABHASETWAR, 2014; AZHDARZADEH et al., 2015). Devido à exposição humana e ambiental às NPs ter se tornado cada vez mais comum com o emprego de NPs em produtos, a pesquisa focada no nanotoxicologia tem ganhado mais atenção (LEWINSKI, COLVIN & DREZEK, 2008).

É fato que as NPs não podem ser generalizadas simplesmente como nano fármacos. Muitas abordagens chamadas de nanoterapêuticas são utilizadas na clínica, como Abraxane® e Doxil® e servem para reduzir a toxicidade de drogas encapsuladas. Em contrapartida, outras NPs que estão atualmente sendo submetidas a investigação pré-clínica, como NPs metálicas e base de carbono, normalmente exibem efeitos citotóxicos. Este potencial citotóxico poderia ser benéfico se endereçado a tecidos tumorais, por exemplo. Os efeitos nocivos destas NPs baseiam-se principalmente na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos a compartimentos celulares e reações imunológicas. Além disso, a toxicidade pode se manifestar a nível tissular, celular e molecular (Figura 1.3) (WOLFRAM, 2015).

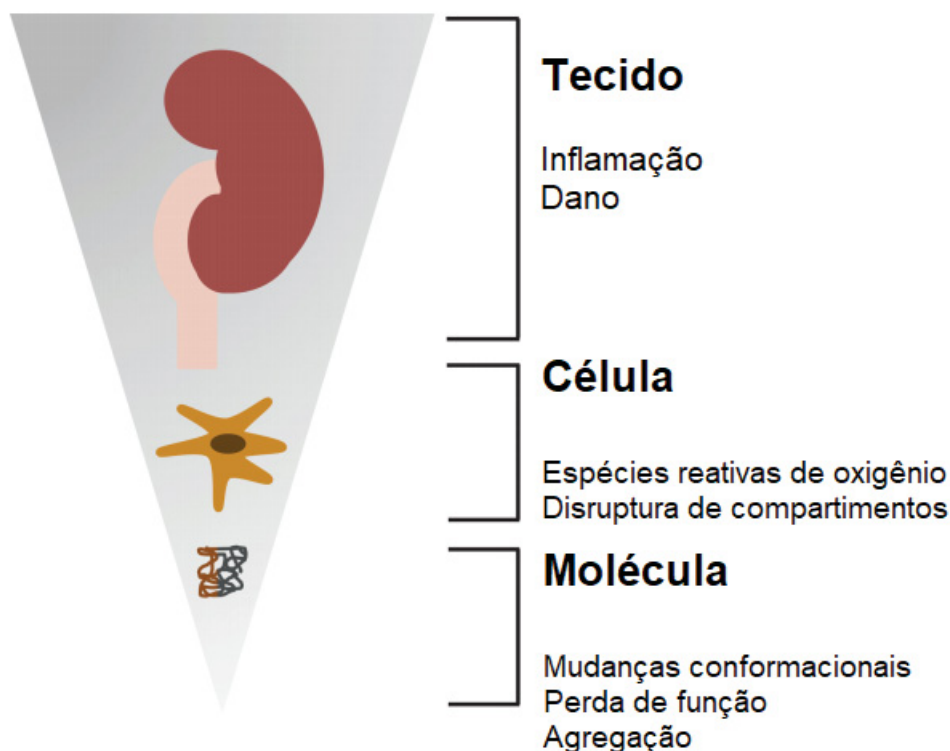


Figura 1. 3: Representação esquemática de alguns efeitos tóxicos que podem ser induzidos por NPs em difentes níveis, molecular, celular e tecidual. Adaptado de: WOLFRAM, 2015.

Entender a interação entre NPs e sistemas biológicos consiste em um fator chave para que sua aplicação seja segura e eficiente (Rahman et al., 2013). As propriedades físico-químicas únicas das NPs fazem com que a investigação acerca da sua toxicidade seja intrigante e desafiadora. Portanto é imprescindível que se tenha um conhecimento aprofundado dos diferentes mecanismos envolvidos tanto nos mecanismos de ação, quanto aos efeitos adversos causados pelas NPs (JAIN et al., 2018).

Embora existam vários dados em literatura sobre a toxicidade ou segurança de NPs, até o momento ainda não há consenso quanto ao efeito destas partículas sobre sistemas biológicos. Uma melhor compreensão acerca da toxicidade das NPs pode ajudar a evitar efeitos adversos, bem como auxiliar na construção das NPs, já que em muitos casos, modificações na superfície das NPs podem torná-las menos tóxicas, permitindo sua aplicação em terapia médica.

Além disso, muitos produtos contendo NPs que se encontram no mercado não declaram a composição dos materiais utilizados ou não apresentam informações suficientes que corroborem seus atributos (VANCE et al., 2015). A

Europa tem tentado fortemente elaborar políticas que sejam coerentes com essa nova classe de partículas, mas apesar dos esforços das autoridades europeias, a legislação atual ainda se encontra estratificada e sujeita a críticas devido à falta de conhecimento científico bem estabelecido quanto aos nanomateriais. Devido ao fato de que muitos nanomateriais têm suas aplicações em produtos de saúde, novas iniciativas regulatórias são necessárias (MUSAZZI et al., 2017).

A situação que estamos enfrentando atualmente é do surgimento de uma enorme quantidade de NPs emergentes. Para atender essa demanda, métodos de alta eficiência e boa relação custo-benefício, assim como metodologias que busquem o bem-estar animal se fazem necessárias a fim de se obter dados de toxicidade a partir de milhares de NPs diferentes. Dentro deste contexto, testes baseados em células consistem, sem dúvida, no método de *screening* mais aplicável no momento (PAN, BARTNECK & JAHNEN-DECHENT, 2012).

O desenvolvimento de métodos padronizados e métricas para a caracterização de NPs e rotulagem em produtos de consumo pode levar a uma melhor compreensão tanto pela indústria, pesquisadores, agentes regulatórios, quanto consumidores (VANCE et al., 2015).

1.4 Nanopartículas em produtos para saúde

Dentre todos os tipos de NPs, algumas delas têm chamado mais a atenção no que se refere o seu emprego na área biomédica. O avanço nanotecnológico proporcionou uma rápida difusão de NPs destinadas ao uso nesta área; cerca de 42% dos produtos levantados no Inventário de Produtos de Consumo de Nanotecnologia são destinados à aplicação biomédica (VANCE et al., 2015).

A criação de NPs “inteligentes” com respostas programadas para estímulos na área biomédica tem se tornado cada vez mais uma realidade. Estes estímulos podem ser projetados para responder exogenamente (como campo magnético, temperatura, ultrassonografia, luz ou pulsos elétricos) ou mesmo endogenamente (pH, atividade enzimática, gradientes redox). Estas respostas permitem que elas sejam aplicadas para o uso em biosensores, medicamentos (*drug delivery*), imagenologia e novos sistemas diagnósticos (LI et al., 2017).

Alguns tipos de NPs ainda apresentam propriedades magnéticas, as quais podem ser bastante exploradas para ressonância magnética, terapia do câncer, endereçamento de drogas e genes, reparo ósseo e dentário, biosensores, dentre outros (LI et al., 2016).

Um ponto bastante interessante é que as NPs conseguem interagir de forma mais acurada em dispositivos biomédicos uma vez que a maioria dos sistemas biológicos também se encontra em escala nanométrica (RAMOS et al., 2017). Células (as quais são maiores que 100 nm) podem englobar vírus (75-100 nm), proteínas (5-50 nm) e ácidos nucleicos (2 nm), portanto, o mesmo ocorre para NPs (1-100 nm) (PATEL et al., 2015).

As NPs encontram-se em estágios diferentes dentro do mercado; algumas já estão sendo aplicadas em alguns produtos, enquanto outras ainda estão sendo avaliadas quanto a suas potenciais aplicações. Até o momento, 371 estudos clínicos estão sendo conduzidos com NPs no mundo (Figura 1.4), sendo a maioria deles no EUA (201 estudos), seguido pela Europa (54 estudos) (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019).

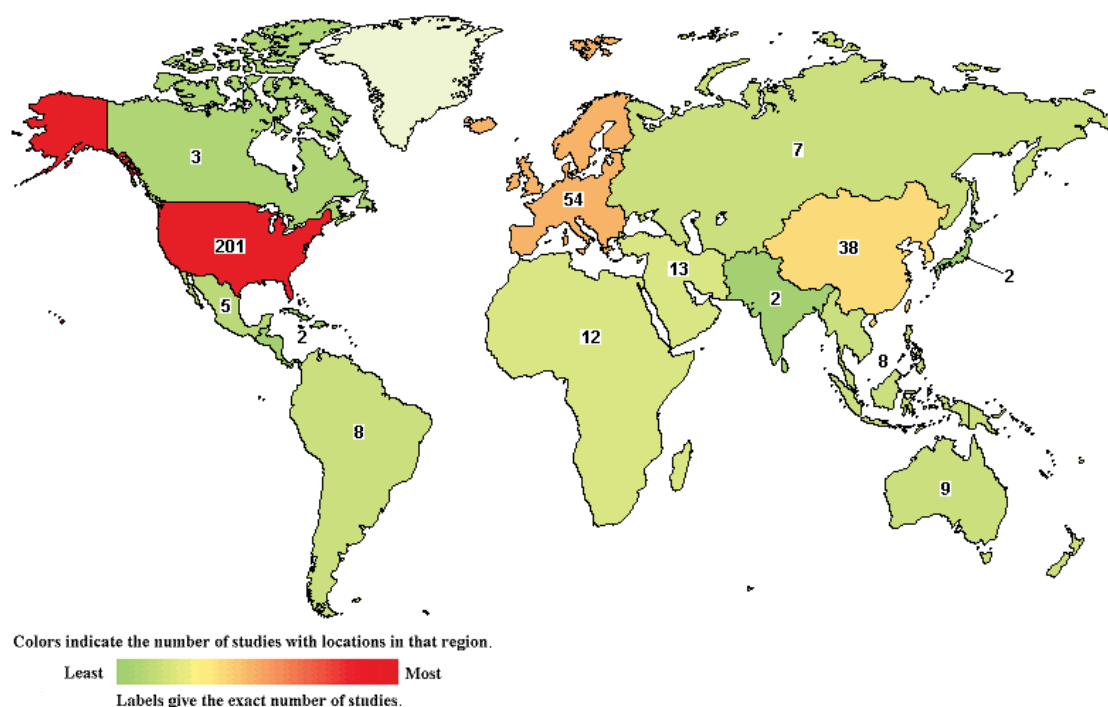


Figura 1. 4: Estudos Clínicos com nanopartículas. Número de estudos clínicos registrados no site www.clinicaltrials.gov, total de 371.

Como exemplos de alguns tipos de NPs com aplicações biomédicas, temos (Tabela 1.1):

Material de Origem	<i>Ferro</i>	<i>Ouro</i>	<i>Bismuto</i>	<i>Sílica</i>
Principais características	Magnéticas Catalíticas	Facilmente produzidas Estáveis	Baixo custo	Alta capacidade de funcionalização Baixo custo
Produtos no Mercado*	6	15	0	44
Ensaio Clínicos**	20	12	0	6
Aplicações	Diagnóstico por imagem Hipertermia (câncer) Drug delivery Separação magnética	Diagnóstico por imagem Tratamento do câncer Drug delivery Detecção química	Diagnóstico por imagem Tratamento do câncer Redução da toxicidade renal associada a cisplatina Germicida (<i>Candida sp.</i> , <i>H. Piloni</i> , syphilis)	Diagnóstico por imagem Alimentos Cosméticos Virucida Quantificação bacteriana
Referências	(HUBER, 2005; DINALI et al., 2017)	(ALKILANY & MURPHY, 2010; FAN et al., 2011; IRANI et al., 2015; KANG et al., 2015)	(LUO et al., 2012; HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2013)	(MOHAMED et al., 2011; BITAR et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2016; ZHAO et al., 2004)

Tabela 1. 1: NPs de ferro, ouro, bismuto e sílica e suas principais características, produtos já comercializados no mercado, ensaios clínicos em andamento e possíveis aplicações.

Dados obtidos de:

* http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=&asmSelect0=&date_created=&date_modified=&nanomaterials%5B%5D=1138&search-products_submit=Search&_submitKey=16%3Asearch-products%3A0

**<http://www.clinicaltrials.gov>

1.5 Nanopartículas de ferro

A reatividade do ferro é importante e conhecida em todas as suas aplicações macroscópicas; atualmente, este metal tem sido amplamente estudado para uso em nanoescala. O ferro oferece diversas vantagens em nanoescala pelo fato de possuir características como suas propriedades magnéticas e catalíticas únicas (DINALI et al., 2017).

As NPs de ferro/óxido de ferro consistem em arranjos de ânions preenchidos com ferro divalentes ou trivalentes (Silva et al., 2014). Existem 16

diferentes tipos de óxido de ferro, sendo eles a goetita, wustita, lepidocrocita, ferridrita, feroxita, bernalita, hematita, magnetita, maghemita, dentre outros (CORNELL & SCHWERTMANN, 2006).

As NPs de ferro (FeNPs) consistem em um dos tipos de NPs mais desenvolvidos e utilizados dentro da microbiologia e biotecnologia (DINALI et al., 2017). Sendo assim, as FeNPs possuem diversas aplicações biomédicas, como a marcação e a separação magnética de tecidos biológicos, endereçamento de drogas (*drug delivery*), aumento de contraste na ressonância magnética e no tratamento da hipertermia (HUBER, 2005). Além disso, FeNPs tem atraído muita atenção no que se refere a imobilização bacteriana, uma vez que FeNPs possuem afinidade química e física por bactérias, ligando-se a elas e portanto, conferindo às mesmas propriedades magnéticas (RANMADUGALA et al., 2018). Dependendo da cepa do microrganismo e da concentração das NPs, estas podem estimular ou inibir o crescimento microbiano. Além disso, devido a suas características superparamagnéticas, estas NPs podem ser fontes de calor para hipertermia em tecidos infecciosos (DINALI et al., 2017). FeNPs carregadas de antibióticos também podem representar uma alternativa muito interessante para o *delivery* destas drogas diretamente ao órgão infectado (DINALI et al., 2017). Estas e outras aplicações estão descritas na figura abaixo (Figura 1.5).

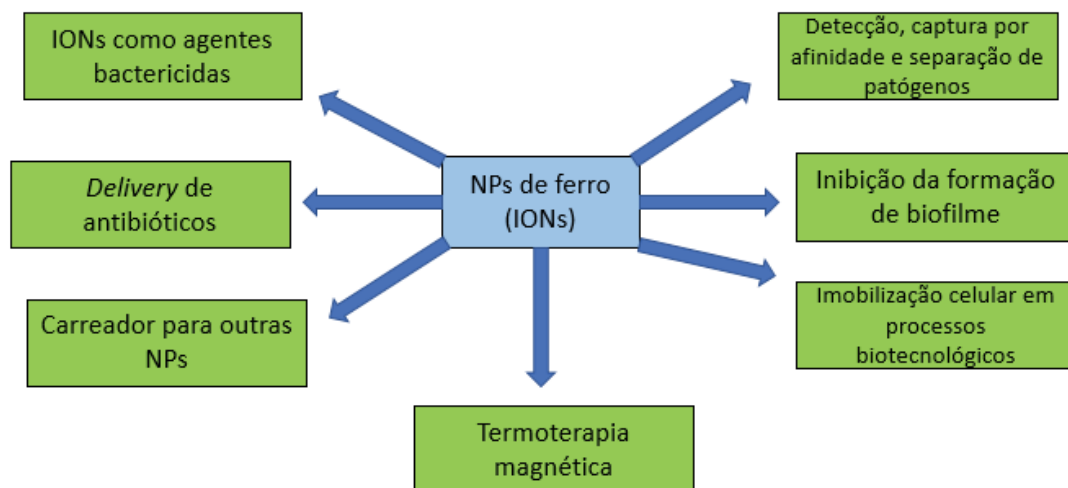


Figura 1. 5: Diagrama esquemático demonstrando as aplicações de NPs de ferro (descritas como IONs) na microbiologia, biotecnologia e medicina moderna. Adaptado de: DINALI et al., 2017.

Uma falha comum na aplicação das NPs consiste tanto na falta de informações, quanto em dados contraditórios no que se refere a seletividade de

ação destas NPs sob determinadas cepas. Para qualquer aplicação prática, é crucial o entendimento da interação entre as FeNPs e o mecanismo alvo (DINALI et al., 2017). Além disso, embora o número de aplicações de FeNPs seja bastante vasto, as informações disponíveis atualmente sobre o seu potencial de toxicidade ainda são escassas e dados controversos tem sido reportados (VALDIGLESIAS et al., 2016).

Em 2009, Mahmoudi e colaboradores avaliaram a citotoxicidade de diversos tipos de FeNPs de diferentes tamanhos e formatos em fibroblastos de ratos através do ensaio do MTT e observaram que quando maior o tamanho hidrodinâmico das FeNPs, menores eram os efeitos citotóxicos. Em 2011, Soenen e colaboradores utilizaram diferentes concentrações de NPs de ferro e avaliaram alguns parâmetros em diferentes tipos celulares. Os autores observaram que o citoesqueleto, a morfologia celular e a área total ocupada pelas adesões focais foram afetados após o tratamento com altas concentrações destas NPs. Já em 2014, Seabra e colaboradores avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de dois tipos de NPs de óxido de ferro em quatro tipos celulares diferentes: linfócitos humanos, células 3T3, CHO e MCF-7. Observou-se, neste caso, que em duas das três concentrações de NPs utilizadas, houve uma redução na viabilidade celular relativa de linfócitos e células MCF-7, bem como danos ao DNA concentração-dependente nestes mesmos tipos celulares. Da mesma forma, Hanot e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade de diferentes tipos de NPs de ferro através dos ensaios de MTT e sulforrodamina B, bem como avaliação da formação das espécies reativas de oxigênio. Foi observado um aumento concentração-dependente na toxicidade destas NPs sob células CHO, sugerindo os autores que a citotoxicidade destas partículas ocorre devido a formação de espécies reativas de oxigênio após internalização das partículas pelas células. É importante salientar que diversos estudos têm sido conduzidos na tentativa de entender como estes nanomateriais interagem com sistemas celulares e se potenciais efeitos adversos podem ser decorrentes da exposição a estas NPs (VALDIGLESIAS et al., 2016). Até o momento, 20 estudos clínicos com estas NPs estão documentados e eles incluem o uso de FeNPs principalmente para diagnóstico por imagem, termoablação magnética para o tratamento do câncer e tratamento fototérmico de aterosclerose (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019).

1.6 Nanopartículas de ouro

As NPs de ouro (AuNPs) têm atraído muito interesse científico e tecnológico devido a sua facilidade de síntese, estabilidade química e propriedades ópticas únicas. AuNPs são relativamente inertes no microambiente biológico e possuem um número de propriedades físicas adequadas para diversas aplicações biomédicas (ZHANG, 2015). Além disso, AuNPs consistem em excelentes plataformas para o desenvolvimento de biosensores colorimétricos uma vez que elas podem ser facilmente funcionalizadas, exibindo diferentes cores de acordo com o seu tamanho, forma e estado de agregação (ALDEWACHI et al., 2017), além de poderem ser conjugadas facilmente a ligantes, drogas e outras moléculas-alvo (ZHANG, 2015).

Estudos têm demonstrado sua ampla aplicabilidade biomédica, como em detecção química, imagenologia, endereçamento de drogas (*drug delivery*) e no tratamento do câncer (ALKILANY & MURPHY, 2010; FAN et al., 2011; IRANI et al., 2015; KANG et al., 2015) (Figura 1.6). Estas NPs já foram empregadas com sucesso para hipertermia direcionada a tumores, como contraste na tomografia computadorizada, como carreadores de drogas para *drug delivery* e microscopia fototermal (ZHANG, 2015).

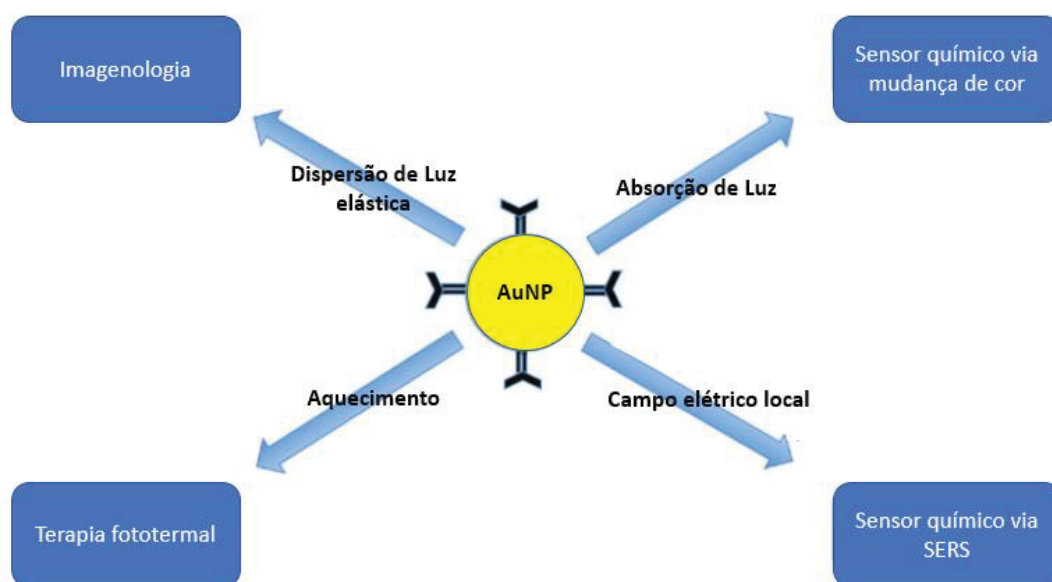


Figura 1. 6. Exemplo esquemático demonstrando os efeitos físicos inerentes às AuNPs, os quais permitem as mais diversas aplicações destas NPs. Adaptado de: ALKILANY & MURPHY, 2010.

A utilização de AuNPs já é uma realidade no que se refere ao tratamento

de algumas doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide. No entanto, a utilização destas NPs tem se tornado limitada devido a associação delas com a alta incidência de efeitos adversos (CARNEIRO & BARBOSA, 2016).

Muito embora estas partículas sejam interessantes do ponto de vista biomédico, pouco se sabe em relação a atividade biológica delas quando em contato com células nos tecidos humanos (KOHL, GORJUP & KATSEN-GLOBA, 2011). Muito embora o ouro seja biologicamente inerte, a baixa taxa de *clearance* tanto da circulação quanto dos tecidos pode acarretar em problemas para saúde. Sendo assim, a avaliação de efeitos de AuNPs em órgãos-alvo e modelos celulares que mimetizem este microambiente são necessários antes da aplicação na rotina médica para humanos (ZHANG, 2015).

Em 2015, Dasari e colaboradores realizaram um estudo avaliando a atividade de AuNPs sob diversas cepas de bactérias e observaram que além da sua atividade antibacteriana, estas NPs foram citotóxicas a queratinócitos e linfócitos humanos. Em 2015, Irani e colaboradores observaram que as AuNPs, quando associadas a um jato de plasma, levaram à apoptose de células HCT-116 (células de câncer colorretal humano).

Em 2016, Hashimoto e colaboradores realizaram um estudo com AuNPs e AgNPs (NPs de prata), onde observaram certas vantagens das AuNPs em relação as AgNPs, como ausência de citotoxicidade e resposta inflamatória em fibroblastos murinos. Em contrapartida, foi constatado que ambos os tipos de NPs levaram a inibição da metaloproteinase MMP-1, sugerindo que sejam relevantes do ponto de vista clínico no tratamento do câncer.

Recentemente, em 2018, Lopez-Chaves e colaboradores realizaram um extenso estudo com AuNPs de diferentes tamanhos, avaliando a toxicidade *in vivo* e *in vitro*. Para tanto, células HT-29 e HepG2, bem como ratos Wistar, foram expostos a AuNPs de 10, 30 e 60 nm para determinação de distribuição, localização celular e avaliação de efeitos deletérios. Os resultados demonstraram que AuNPs acumularam-se no intestino, rins, fígado, baço, fezes e urina. Estas NPs foram encontradas dentro de células do cólon e fígado. Muito embora o tamanho das NPs não tenha acarretado em diferenças na viabilidade celular relativa, foi possível observar que o tamanho das AuNPs teve um grande impacto na biodistribuição, rota de excreção, bem como efeitos deletérios, elucidados pela localização das NPs no núcleo celular e maior dano ao DNA de

forma tamanho dependente e inversamente proporcional (quanto menor a AuNP, maior o dano celular). Até o momento, existem registrados 12 estudos clínicos relacionados a AuNPs e estes incluem principalmente tratamento fototérmico para aterosclerose, tratamento do câncer e diagnóstico da doença de Parkinson (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019).

Para avaliações terapêuticas e toxicológicas de AuNPs, mais estudos que desvendem como esta relação NP-sistemas biológicos acontecem, bem como o estabelecimento de uma margem de segurança para o uso terapêutico de AuNPs devem ser realizados (CARNEIRO & BARBOSA, 2016).

1.7 Nanopartículas de bismuto

As NPs de bismuto (BiNPs) consistem em NPs bastante interessantes do ponto de vista industrial e têm sido amplamente investigadas a fim de serem empregadas nos mais diversos campos (CLAUDIO & CHELLAM, 2014). BiNPs são bastante versáteis pelo fato de apresentarem diversas propriedades medicinais importantes, agindo como bactericidas, fungicidas, antibiofilme e antivirais (HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2017). Sendo assim, estas NPs tem sido avaliadas quanto ao seu emprego em antissépticos orais (CLAUDIO & CHELLAM, 2014; EL-BATAL et al., 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2013; HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2017). Além disso, BiNPs tem sido estudadas para seu emprego em termo-quimioterapia, imagenologia (LI et al., 2016; LIU et al., 2015; SWY et al., 2014; VEINTEMILLAS-VENDAGUER et al., 2015) e como um potencial agente de radiosensibilização para radioterapia com raios X (STEWART et al., 2016). Em relação as suas aplicações industriais, BiNPs são bastante promissoras devido ao seu baixo custo quando comparadas com outras NPs metálicas (CLAUDIO & CHELLAM, 2014). Muito embora muitos compostos derivados de bismuto já tenham sido amplamente empregados para fins médicos, industriais e cosméticos por muitas décadas, pouco se sabe em relação a toxicidade do bismuto quando encontrado em nanoescala (ABUDAYYAK et al., 2017).

Muito embora a literatura acerca da toxicidade de BiNPs seja escassa, alguns trabalhos já avaliaram alguns parâmetros importantes em relação BiNPs. É importante ressaltar que a maior parte destes estudos tem avaliado NPs de óxido de bismuto (ABUDAYYAK et al., 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO et al.,

2013; LIMAN, 2013) ou mesmo NPs de ferrito de bismuto (STAEDLER et al., 2015), sendo a maior parte delas também produzidas quimicamente.

Em 2017, Abudayyak e colaboradores realizaram um estudo com células de diferentes órgãos (HepG2, NRK-52E, Caco-2 e células A549) e através de avaliações de viabilidade celular relativa (MTT e vermelho neutro), demonstraram valores de IC₅₀ de Bi₂O₃NPs entre 35,11 e 96,55 µg/ml. Além disso, neste trabalho, demonstrou-se que a via de morte celular desencadeada pelas BiNPs foi apoptose, com mudanças significativas nos níveis de glutathiona, malondialdeído e 8-hidroxideoxiguanina, indicativo de dano oxidativo. Ainda, foi constatado através deste trabalho a internalização destas BiNPs pelas células.

Já em 2017, Liu e colaboradores demonstraram através da técnica do MTT que a viabilidade de células humanas A549 e HEK293 decrescia quando as células eram expostas a 160 µg/ml de BiNPs. Além disso, demonstrou-se através deste estudo que células HEK293 endocitam BiNPs através de uma via não mediada por clatrina e que a toxicidade do bismuto está relacionada ao processo de autofagia. Mais recentemente (2018), este mesmo grupo demonstrou que BiNPs levam a injúria renal temporária em ratos, processo que está relacionado a autofagia.

Staedler e colaboradores (2015) demonstraram que BiNPs eram endocitadas por células A549, NCI-H520 e THP-1 e após 72 horas, e que formavam agregados em organelas intracelulares, como lisossomos ou endossomos. Em 2012, Luo e colaboradores observaram que NPs de bismuto recobertas por diferentes grupamentos químicos levaram a citotoxicidade em células HeLa e MG-63. Em 2013, Liman demonstrou que NPs de óxido de bismuto causaram efeitos genotóxicos a células meristemáticas de *Allium cepa*.

Diferentemente de outros tipos de NPs, as BiNPs chamaram atenção apenas recentemente. Até o momento, não existem estudos clínicos com este tipo de NP (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019), ou mesmo algum produto no mercado que as contenha na composição (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019). Sendo assim, um dos principais passos antes o uso destas NPs seja concretizado consiste na avaliação de toxicidade e segurança das mesmas de forma robusta e concisa.

1.8 Nanopartículas de sílica

As NPs de sílica (SiO_2NPs) têm sido avaliadas quanto a sua aplicabilidade nos campos biomédicos e biotecnológicos, como diagnóstico de doenças, imagenologia, *drug delivery*, desenvolvimento de alimentos, cosméticos e biosensores (BITAR et al., 2012; MOHAMED et al., 2011). Quando funcionalizadas com outros grupamentos químicos, estas NPs podem ainda desenvolver um papel virucida, como descrito pelo grupo do Dr. Mateus Borba da Unicamp (DE SOUZA E SILVA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2016). Como estas NPs possuem uma alta capacidade de funcionalização, elas podem ser facilmente conjugadas com moléculas fluorescentes, resultando em NPs fluorescentes. Estas NPs, em particular, possuem uma série de vantagens adicionais como a detecção das NPs dentro e na superfície celular (IZAK-NAU et al., 2014), funcionando como sensores lisossomais (ZHANG et al., 2015), agentes de bioimagem (GOMES et al., 2016) e sensores químicos (BURNS et al., 2016), podendo também ser utilizados para quantificação bacteriana (ZHAO et al., 2004). Além disso, estas NPs são particularmente interessantes devido a sua fácil produção a um baixo custo. Sendo assim, o seu uso tem crescido exponencialmente em produtos (Figura 1.7) (IZAK-NAU et al., 2013).

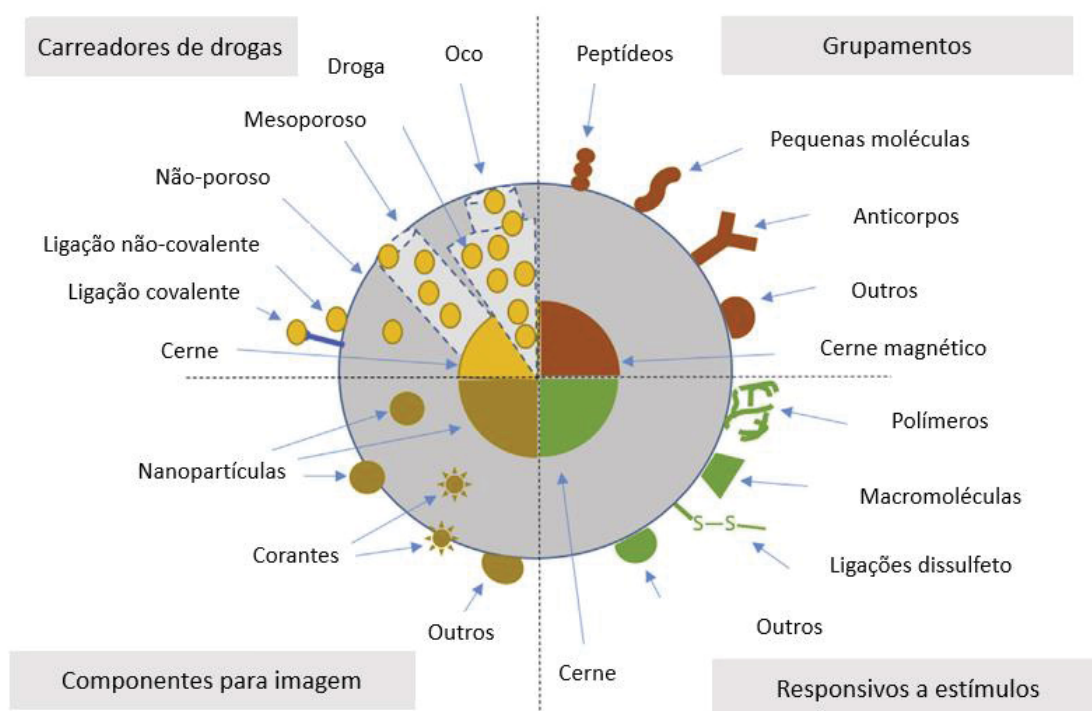


Figura 1. 7: Representação esquemática de NPs de sílica (SiO₂NPs). Carreadores de drogas: tipos de SiO₂NPs para a entrega de agentes biologicamente ativos e drogas. Grupamentos: grupamentos encontrados na superfície de SiO₂NPs ou compostos magnéticos. Responsivos a estímulos: SiO₂NPs respondendo a estímulos como por exemplo pH, glutatona, campo magnético, luz, temperatura. Componentes para imagem: SiO₂NPs para ressonância magnética, aplicações ópticas e de imagem. Adaptado de: MEBERT et al., 2017.

No que se refere a segurança de sua utilização, alguns estudos já investigaram a citotoxicidade de SiO₂NPs. Em 2006, Lin e colaboradores avaliaram a ação de SiO₂NPs e observaram que a citotoxicidade ocorre de forma dose e tempo-dependente e que está relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio, levando a lipoperoxidação e dano à membrana celular. O mesmo fenômeno foi também descrito por Wang e colaboradores em 2009. Ainda no mesmo ano, Choi e colaboradores (2009) compararam a citotoxicidade de SiO₂NPs com outros tipos de NPs e observaram que a sílica levou a uma resposta inflamatória com reduzida morte celular por apoptose quando comparada com os demais tipos. Mais recentemente, Kim e colaboradores (2017) concluíram que a toxicidade de SiO₂NPs depende do tamanho, dose e tipo celular. Neste estudo eles também observaram que apenas as SiO₂NPs de 60 nm foram endocitadas por células endoteliais de córnea humana, resultando em um decréscimo na viabilidade celular (avaliada por CCK-8). Para a avaliação de SiO₂NPs, diversas estratégias já foram utilizadas, incluindo a funcionalização destas NPs a fluoróforos. Em 2012, Uboldi e colaboradores avaliaram 5 diferentes tipos de SiO₂NPs e 1 tipo de SiO₂NPs marcada com fluorescência frente às células BALB/c 3T3; constatou-se que nas concentrações utilizadas, as SiO₂NPs não foram tóxicas para as células, nem levaram a mudanças morfológicas ou danos genotóxicos. Além disso, pelo fato de terem utilizado uma NP marcada, foi possível observar que as NPs são internalizadas e se localizam na região perinuclear. Alguns outros trabalhos que empregaram tanto SiO₂NPs fluorescentes quanto não-fluorescentes já demonstraram que SiO₂NPs são internalizadas através de uma via dependente de ATP: a endocitose mediada por clatrina (HSIAO et al., 2014; HU et al., 2011). Além disso, já foi demonstrado que SiO₂NPs são acumuladas no citoplasma das células culminando em disfunção lisossomal (SCHUTZ et al., 2016); esta mesma organela foi descrita como responsável pela exocitose de SiO₂NPs (YANES et al., 2013). Um fato bastante intrigante ainda relacionado a toxicidade destas partículas consiste em

uma patologia denominada de podoconiose, ou elefantíase endérmica não-infecciosa, uma epidemia encontrada na Etiópia e que é relacionada a exposição dos pés a solos ricos em nanopartículas de sílica (LE BLOND et al., 2017).

Em relação a estudos clínicos, 6 estudos conduzidos no mundo todo relacionam-se a SiO₂NPs. Estes consistem no emprego destas NPs para diversos fins, como mapeamento de metástases, terapia nanofototérmica para aterosclerose e tratamento de periodontite (U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019).

Até o momento, 43 produtos que empregam SiO₂NPs já estão sendo comercializados, como em materiais de construção e de limpeza, acessórios automotivos, eletrônicos e até cosméticos e suplementos alimentares. É importante salientar que para a maioria desses produtos há ausência de informações no que se refere a categoria de segurança (*unsupported claim*) (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019). Portanto, para que possamos usufruir de forma segura das inúmeras vantagens das SiO₂NPs é preciso avaliar a interação com sistemas biológicos.

1.9 Avaliação da citotoxicidade através de métodos *in vitro*

Para avaliação de toxicidade de compostos, métodos *in vivo* e *in vitro* podem ser utilizados. O amplo interesse público e científico em promover o cuidado e bem dos animais utilizados para testes de toxicidade levou a significativas melhorias nas práticas de bem-estar animal, bem como leis e regulamentos que visem reduzir, refinar e substituir (conhecido como 3 Rs – do inglês “*Refine, Reduce, Replace*”) o uso de animais em testes de toxicidade (FORD, 2016). As metodologias *in vitro* possuem muitas vantagens, uma vez que são mais rápidas, baratas, convenientes, além de possuírem menos questões éticas envolvidas do que as metodologias *in vivo* (FARD, JAFARI & EGHBAL, 2015). Com esta finalidade, comitês nacionais e internacionais foram criados com o objetivo de organizar a validação de métodos alternativos, como o ECVAM (*European Centre for The Evaluation of Alternative Methods*) na Europa, e o ICCVAM (*The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*) nos EUA. Dentre todos os métodos reconhecidos pelas

agências regulatórias, linhagens celulares como BALB/c 3T3 (fibroblastos murinos) ou NHK (queratinócitos humanos normais) consistem em substratos celulares muito conhecidos para testes de citotoxicidade *in vitro* (OECD, 2010).

Dados de toxicidade aguda são exigidos por quadros normativos regulatórios a fim de fornecer advertências para classificação de risco e rotulagem e para entender sobre possíveis consequências após a exposição a substâncias como produtos químicos industriais, biocidas, pesticidas, ingredientes cosméticos e produtos farmacêuticos (ECCVAM, 2018). Além disso, a avaliação de toxicidade oral aguda consiste tipicamente no primeiro passo para a identificação e caracterização dos perigos causados por substâncias químicas (ICCVAM, 2001). O valor de DL_{50} , definido como a dose que leva a morte de 50% dos animais em um determinado período de tempo, é atualmente a base para a classificação toxicológica de químicos (WALUM, 1998). Assim, a avaliação da toxicidade sistêmica oral é recomendada para qualquer tipo de substância que será destinada para fins de saúde, incluindo NPs.

Porém, muito embora o teste de toxicidade oral aguda seja um requisito padrão para fins regulatórios, a realidade que encontramos hoje é a proibição de testes em animais para determinados produtos (como cosméticos) e a busca intensa pela redução do uso de animais para outros produtos (produtos químicos industriais) (PRIETO et al., 2013).

Para a predição de toxicidade oral aguda *in vitro* e com o objetivo de reduzir o número de animais para classificação e rotulagem de químicos, metodologias já padronizadas e validadas existem e já são implementadas no mundo todo. A OECD *Guideline* no. 129 consiste em um documento guia para testes de citotoxicidade que visa estimar as doses iniciais para os ensaios de toxicidade oral aguda através do ensaio de captação do vermelho neutro (OECD, 2010). A partir deste ensaio, é possível, através de metodologia *in vitro*, predizer a DL_{50} (dose letal 50%). Uma vez predita a DL_{50} , é possível então predizer a classificação da substância avaliada como pertencente da categoria 1 a categoria 6 de toxicidade GHS (ICCVAM, 2006), conforme a tabela 1.2. O grande objetivo desta metodologia é reduzir o número de animais utilizados para testes de toxicidade oral aguda (STOKES et al., 2008), uma vez que os testes de DL_{50} tradicionais estão sendo cada vez mais desencorajados enquanto novos métodos estão sendo desenvolvidos e endossados pelos órgãos relatórios

(ERHIRHIE et al., 2018).

Classe GHS:	DL ₅₀
Categoria 1	DL ₅₀ ≤ 5 mg/kg
Categoria 2	5 < DL ₅₀ ≤ 50 mg/kg
Categoria 3	50 < DL ₅₀ ≤ 300 mg/kg
Categoria 4	300 < DL ₅₀ ≤ 2000 mg/kg
Categoria 5	2000 < DL ₅₀ ≤ 5000 mg/kg
Categoria 6	DL ₅₀ > 5000 mg/kg

Tabela 1. 2: Categorias GHS e seus respectivos valores de DL₅₀.

As células BALB/c 3T3 consistem em uma das principais linhagens celulares utilizadas para estimar as doses iniciais dos testes de toxicidade sistêmica oral aguda (ICCVAM, 2001, OECD 423). As células BALB/c 3T3 tem sido muito utilizadas para avaliação de toxicidade (ABUD et al., 2015; HROUZEK et al., 2016; THORNE et al., 2014), inclusive para avaliação da citotoxicidade de NPs (MANNERSTRÖM et al., 2016; STOCCORO et al., 2016; UBOLDI et al., 2016). Estudos já demonstraram que células BALB/c 3T3 são mais precisas na avaliação de toxicidade *in vitro* quando comparadas a outras linhagens como Caco-2, HepaRG, HepG2, HeLa e hepatócitos (BROEDERS, BLAAUBOER, & HERMENS, 2013; HROUZEK et al., 2016). Broeders e colaboradores (2013) e Hrouzek e colaboradores (2016) compararam as respostas de células 3T3 com outros tipos celulares em relação a avaliações de citotoxicidade e constataram que as células 3T3 foram as mais sensíveis e acuradas para avaliação de citotoxicidade *in vitro*. Sendo assim, a utilização destas células para a avaliação da toxicidade de NPs pode representar uma abordagem bastante interessante e um modelo possível para a avaliação de risco de NPs.

Em um documento recente da OMS (LEE et al., 2017), elaborou-se um documento visando estabelecer guias relacionados a saúde ocupacional de trabalhadores expostos a NPs para 11 nanomateriais que são amplamente produzidos e que tiveram estudos conduzidos de acordo com as normas da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), como NPs de sílica, óxido de zinco, prata, dióxido de titânio, dentre outros. Como conclusão,

de acordo com o tipo de NP, a categorização de risco muda. Desta forma, é importante avaliar cada nanomaterial quanto ao seu potencial tóxico.

Devido à grande diversidade de propriedades físico-químicas de NPs, bem como da vasta complexidade dos sistemas de avaliação, há uma grande necessidade da elaboração de estratégias avançadas e altamente acuradas para estudar as interações NP-células, bem como a toxicidade. Técnicas multidisciplinares utilizando desde ferramentas *in silico* a avaliações *in vivo* devem ser elaboradas para a avaliação dos possíveis efeitos colaterais associados a NPs. Através da utilização de estratégias realmente apropriadas que permitam a avaliação de risco para tomada de decisão com um melhor entendimento será possível trazer melhores resultados, auxiliando a projetar NPs ambientalmente amigáveis e biologicamente seguras (JAIN et al., 2018). Neste contexto, no presente trabalho o nosso grupo buscou partir de 4 diferentes nanopartículas de interesse para elaboração de produtos para saúde, avaliá-las quanto as características físico-químicas e interação com sistemas biológicos, avaliando citotoxicidade, efeitos celulares a nível ultra-estrutural e mecanismos de morte celular.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito citotóxico e a interação de nanopartículas com possível aplicação em produtos de saúde em cultivo *in vitro* de células eucarióticas BALB/c 3T3 clone A31.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 CAPÍTULO I)

Os objetivos específicos deste capítulo consistiram em:

- a) Produzir e caracterizar FeNPs e AuNPs quanto a propriedades físico-químicas;
- b) Avaliar a citotoxicidade de AuNPs em linhagem de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 através de viabilidade celular;
- c) Obter os valores de IC₅₀ de AuNPs em células BALB/c 3T3;
- d) Predizer matematicamente a DL₅₀ e a classe de toxicidade de AuNPs.

2.2.2 CAPÍTULO II)

Os objetivos específicos deste capítulo consistiram em:

- a) Produzir e caracterizar BiNPs a quanto a propriedades físico-químicas.
- b) Avaliar a citotoxicidade de BiNPs em linhagem de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 através de viabilidade celular.
- c) Obter os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ de BiNPs em células BALB/c 3T3.
- d) Predizer matematicamente a DL₅₀ e a classe de toxicidade de BiNPs.
- e) Avaliar morfológicamente a interação de BiNPs e células BALB/c 3T3.
- f) Avaliar o tipo de morte de celular causado por BiNPs em células BALB/c 3T3.

2.2.3 CAPÍTULO III)

Os objetivos específicos deste capítulo consistiram em:

- a) Produzir e caracterizar SiO₂NPs com e sem fluorescência quanto a propriedades físico-químicas.

- b) Avaliar a citotoxicidade de SiO₂NPs com e sem fluorescência em linhagem de fibroblastos murinos BALB/c 3T3 através de viabilidade celular.
- c) Obter os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ de SiO₂NPs com e sem fluorescência em células BALB/c 3T3.
- d) Predizer matematicamente a DL₅₀ e a classe de toxicidade de SiO₂NPs com e sem fluorescência.
- e) Avaliar morfologicamente a interação de SiO₂NPs sem fluorescência e células BALB/c 3T3.
- f) Avaliar o tipo de morte de celular causado por SiO₂NPs sem fluorescência em células BALB/c 3T3.

3 JUSTIFICATIVA

Os nanomateriais particulados (NPs) já são uma realidade em nosso dia-a-dia. Dentre os diversos tipos de NPs utilizadas, podemos citar as nanopartículas de ferro (FeNPs), ouro (AuNPs), bismuto (BiNPs) e sílica (SiO₂NPs). As FeNPs consistem em um dos tipos de NPs mais desenvolvidos e utilizados dentro da microbiologia e biotecnologia, possuindo além disso, diversas outras aplicações biomédicas, como *drug delivery*, contraste na ressonância magnética e hipertermia. Já as AuNPs têm atraído um enorme interesse científico e tecnológico devido a sua facilidade de síntese e potencial de utilização em detecção química, imagenologia, *drug delivery* e no tratamento do câncer. As BiNPs têm despertado a atenção da indústria recentemente devido a suas propriedades medicinais e seu baixo custo, e por isso têm sido amplamente avaliadas quanto ao seu emprego, principalmente na área biomédica. Já as SiO₂NPs consistem em uma classe de NPs que despertou o interesse da indústria há certo tempo, já sendo uma realidade no mercado em materiais de construção e de limpeza, acessórios automotivos, cosméticos e suplementos alimentares e assim como as BiNPs, as SiO₂NPs também tem sido avaliadas quanto ao seu emprego em produtos de saúde. No entanto, na contramão das diversas vantagens que estas NPs trazem e ainda possam vir a trazer, existem muitas controvérsias à respeito da sua toxicidade quando em contato com sistemas biológicos. Torna-se crucial que se entendam as interações entre as NPs e os sistemas biológicos a fim de que sejam exploradas as aplicações biomédicas das NPs, especialmente para *drug delivery*. Isto é extremamente necessário para que se criem NPs que sejam eficientes, seguras, confiáveis e não-tóxicas. Portanto, estudos robustos capazes de avaliar os possíveis efeitos tóxicos que estes compostos ou produtos que os contenham possam ocasionar representam um passo fundamental antes da consolidação da aplicação destas NPs na área da saúde. Os ensaios *in vitro* para avaliação de toxicidade de compostos têm sido cada vez mais implementados, uma vez que diversas agências regulatórias internacionais têm validado ensaios alternativos ao uso de animais para predição de toxicidade. Para tanto, um dos principais tipos celulares recomendados por estas agências consiste nas células BALB/c 3T3. Desta forma, este trabalho teve como proposta avaliar a toxicidade de FeNPs, AuNPs,

BiNPs e SiO₂NPs através da utilização de células, bem como protocolos sugeridos recomendadas pelas agências regulatórias internacionais, fornecendo evidências científicas que auxiliem na avaliação de risco destas NPs.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

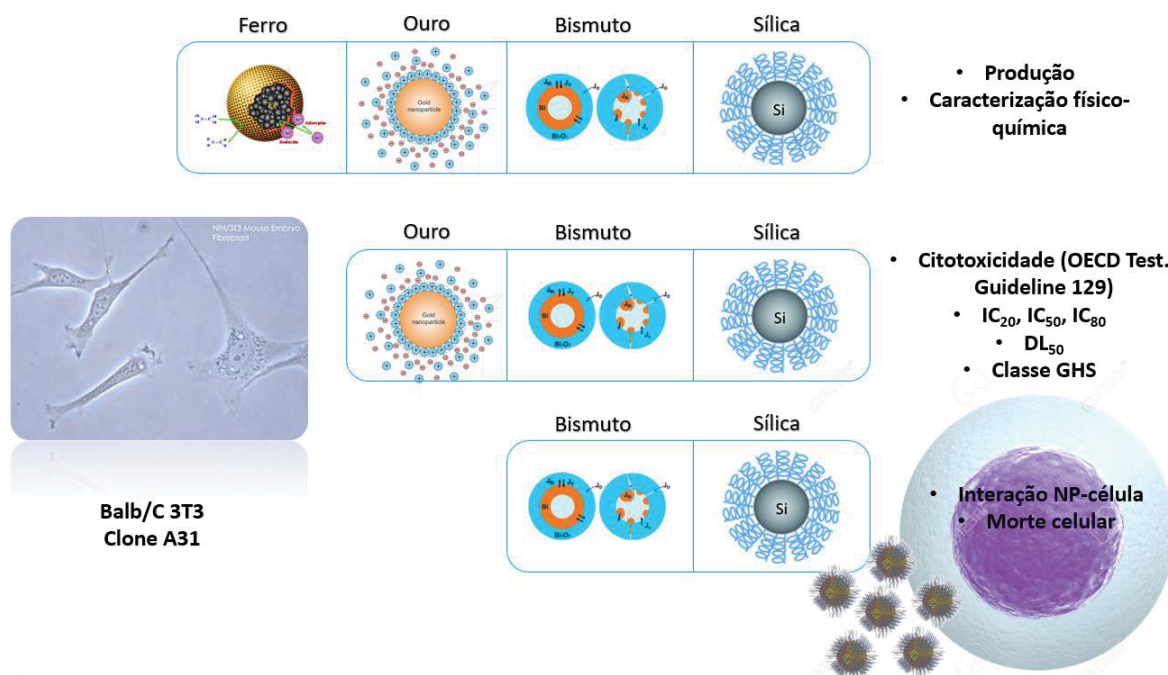


Figura 4. 1: Fluxograma do trabalho: diferentes etapas e avaliações realizadas no presente trabalho. NPs de ferro, ouro, bismuto e sílica foram produzidas e caracterizadas quanto a suas propriedades físico-químicas. Na sequência, NPs de ouro, bismuto e sílica foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade em células BALB/c 3T3 seguindo a OECD *Guideline* 129 e a classe GHS foi predita. Por fim, NPs de bismuto e sílica foram avaliadas quanto a sua interação e o tipo de morte celular causado em células BALB/c 3T3. Fonte: O Autor (2019).

5 CAPÍTULO I – Nanopartículas de ferro e ouro

Neste capítulo do presente trabalho, serão apresentados os resultados de avaliações que foram realizadas, no entanto, não foram publicados devido a descontinuação do trabalho por heterogeneidade e instabilidade das NPs avaliadas. Para tanto, a metodologia geral será abordada e os resultados serão demonstrados e discutidos de acordo com cada nanopartícula utilizada.

5.1.1 METODOLOGIA:

5.1.1.1 *Nanopartículas*

Foram utilizadas NPs sintetizadas em laboratórios colaboradores, entre elas:

1) As NPs de ferro (FeNPs) foram sintetizadas através de síntese química e cedidas pelo Dr. Dimas Augusto Morozin Zaia (Laboratório de Química Prebiótica - Universidade Estadual de Londrina - UEL), seguindo o protocolo descrito e publicado pelo grupo anteriormente (CARNEIRO et al., 2013). Para tanto, uma solução de KOH (hidróxido de potássio) e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (Nitrato de ferro) foram misturadas e armazenadas a 70°C por 60 horas. O precipitado foi então coletado após centrifugação em redisperso em água destilada (processo repetido por 5 vezes). Ao final, o precipitado total obtido foi liofilizado.

2) As NPs de ouro (AuNPs) foram sintetizadas através de síntese física (ablação por raio laser) e cedidas pelo Dr. Arandi G. Bezerra Jr (Laboratório de Nanoestruturas para sensores - Universidade Federal Tecnológica do Paraná - UTFPR), seguindo o protocolo descrito e publicado pelo grupo anteriormente (BEZERRA JR et al., 2018). Para tanto, houve a focalização de um feixe laser pulsado de alta potência na superfície de um alvo sólido de ouro com alto grau de pureza imerso em água bidestilada estéril (solvente). A solução tornou-se roxa à medida que as NPs eram desprendidas do alvo e entravam em contato com o solvente.

5.1.1.2 *Caracterização físico-química das NPs*

As FeNPs foram caracterizadas seguindo as seguintes técnicas:

- Caracterização morfológica: Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (Microscópio JEM-1400 PLUS –JEOL – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR). Para tanto, grades de níquel foram revestidas com uma resina formvar 15/95 0,5% (15800, Electron Microscopy Sciences). Além disso, uma grade de carbono foi adicionada sob as grades revestidas. Após revestimento, cerca de 10 μ L da solução de NPs foram adicionadas sob a grade e aguardou-se a completa secagem. As amostras foram então analisadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET) (Jeol JEM 1400-Plus), com captura de imagens pelo software TEM Center for JEM 1400 Plus.
- Caracterização do perfil de distribuição de tamanho e concentração: equipamento *Nanosight* (NS300 - Instituto Carlos Chagas / Fiocruz-PR). Para tanto, as suspensões contendo as FeNPs foram diluídas 1:1000 em água destilada e inseridas no equipamento *NanoSight* NS300 (Malvern Instruments) para que fossem quantificadas. Por meio do software *NanoSight* LM10 3.6, registraram-se partículas em fluxo contínuo para determinar sua concentração e tamanho, com base na capacidade de dispersão de luz e movimento Browniano. Foram realizados 3 registros de 60 segundos cada e a média de tamanho e distribuição destes 3 registros foi utilizada.

As AuNPs foram caracterizadas seguindo as técnicas:

- Concentração: Espectroscopia UV/Vis (Ocean Optics Model USB2000+ - Laboratório de Nanoestruturas para sensores - Universidade Federal Tecnológica do Paraná - UTFPR). Para tanto, inicialmente foi medido o espectro da luz transmitida pela água destilada (solvente em que as AuNPs foram sintetizadas) a fim de este sinal fosse utilizado como branco. Na sequência, mediu-se o espectro da luz transmitida por meio da solução coloidal de AuNPs.
- Caracterização do tamanho: Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) (Microtrac Nanotrac Ultra model - Laboratório de Nanoestruturas para sensores - Universidade Federal Tecnológica do Paraná - UTFPR). Para tanto, partindo da mesma solução utilizada para a

espectroscopia UV/Vis, realizou-se a medida da suspensão coloidal de AuNPs, informando o tamanho das partículas suspensas no meio líquido.

5.1.1.3 Cultivo celular

Os fibroblastos murinos (3T3) de BALB/c foram adquiridos do Banco de células do Rio de Janeiro- BCRJ na passagem 91. Estas células foram subcultivadas e congeladas para a utilização conforme o experimento. Os lotes celulares utilizados foram descongelados e testados para microplasma, através da coloração com DAPI (Molecular Probes).

Para todos os ensaios, as células foram mantidas e cultivadas conforme estabelecido pelo ICCVAM (ICCVAM, 2006; ABUD et al., 2015) em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 4 mM de L-Glutamina sem a presença de antibióticos a 37°C, em 5% CO₂. Para a realização dos experimentos, estas células foram subcultivadas após desadesão com uma solução de 0,025% de tripsina (Sigma Aldrich) por um período de 3 minutos a 37°C. As culturas eram então observadas ao microscópio óptico para observar a individualização celular e meio DMEM suplementado com SBF era adicionado para fins de inibição enzimática da tripsina e parada da reação. A suspensão celular era então homogeneizada e as células contadas com o auxílio da câmara de Neubauer ao microscópio de luz e com a adição do corante azul de trypan 0,4% (Sigma Aldrich) na proporção de 1:1. Esta etapa era crucial para avaliação de viabilidade celular, uma vez que as células vivas e membrana intacta permanecem sem coloração, enquanto as células mortas incorporam a coloração azul. Para os experimentos, foram consideradas apenas suspensões celulares com viabilidade celular superior a 80%. Após este procedimento, as células eram então plaqueadas para os experimentos e replaqueadas para sua manutenção em cultura, conforme concentrações recomendadas pelas ATCC (*American Type Culture Collection*). Para todos os ensaios, $2,5 \times 10^4$ células/ml foram utilizadas.

5.1.1.4 Avaliação da citotoxicidade das NPs por meio de ensaio de captação do vermelho neutro

Para avaliação da citotoxicidade e posterior predição da dose inicial para ensaio de toxicidade oral aguda, foi utilizada a metodologia validada de captação do vermelho neutro “ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method” (2006). O método permite avaliar o potencial citotóxico de uma droga através da utilização do corante vermelho neutro, o qual é internalizado nos lisossomos de células viáveis; através da análise dos valores de absorbância obtidos por meio desta avaliação, é possível calcular os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀.

Para tanto, 100 uL de suspensão celular a 2.5×10^4 células/ml foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas por 24 horas. Na sequência, 8 diferentes concentrações de AuNPs (26,33; 31,86; 38,55; 46,65; 56,45; 68,30; 82,65 e 100 µg/ml) foram preparadas através de diluição seriada (fator log: 1,21) e acrescidas ao meio de cultura por um período de 48 horas. Após o tempo de incubação, as células tratadas com diferentes concentrações de AuNPs foram incubadas com o corante vermelho neutro (corante catiônico que possui afinidade pelos lisossomos) durante 3 horas. Por fim, o corante foi retirado de dentro das células através de uma solução dessorbante (50% etanol, 1% ácido acético) e a quantidade de corante incorporada pelas células foi mensurada por meio de absorbância obtida no leitor de microplaca a 540 nm (Synergy H1 Multi-Mode reader - Biotek).

Os critérios mínimos de aceitação descritos no método “BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method by ICCVAM” foram rigorosamente seguidos para este teste a fim de que os resultados fossem validados. Estes critérios incluem: 1) Controle positivo com SDS: deve ser realizado sempre um tratamento com SDS (paralelamente em uma placa separada) como um controle positivo de morte celular; caso seja possível o cálculo do IC₅₀ após o tratamento com SDS, o ensaio considera-se validado; 2) Valor mínimo de R²: o R² da curva deve ser maior ou igual a 0,85; 3) Homogeneidade na concentração celular: a diferença dos controles negativos (controle do veículo) não pode ser maior que 15% - assegurando a homogeneidade no momento do plaqueamento (ICCVAM, 2006c).

Uma vez que os resultados obedecessem aos critérios estabelecidos, uma

curva dose resposta foi gerada (Curva de Hill). Desta forma, foi possível calcular os valores que levam a morte de 20 (IC_{20}), 50 (IC_{50}) e 80% (IC_{80}) das células. Ainda, através dos parâmetros obtidos através desta análise, foi possível matematicamente predizer o valor de DL_{50} (dose letal 50%) e inferir a classe de toxicidade (ICCVAM, 2006a; ICCVAM, 2006b; SCANU et al., 2011; ABUD et al., 2015).

5.1.2 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.2.1 *Nanopartículas de Ferro*

O Laboratório de Química Prebiótica da Universidade Estadual de Londrina produz alguns tipos de NPs de Ferro em seus estudos; sendo assim, três tipos de FeNPs foram produzidas por síntese química e cedidas pelo grupo, sendo elas:

- 1) Goethita pura (GP);
- 2) Goethita + cisteína em água destilada (GCD);
- 3) Goethita + cisteína em água do mar (GCM).

O principal objetivo ao avaliar o uso destas NPs consistiu em estudar o potencial de aplicação delas, uma vez que FeNPs tem sido amplamente utilizadas em tintas, plásticos, borracha, materiais de construção, fabricação de papel, produtos alimentícios e farmacêuticos (WANG et al., 2010). Muito embora estas NPs em específico não tenham sido avaliadas até o momento quanto ao emprego na área biomédica, elas poderiam ser um material interessante do ponto de vista industrial se apresentassem homogeneidade e também baixa toxicidade.

Para tanto, a primeira etapa de avaliação destas NPs consistiu na caracterização físico-química das mesmas. A fim de serem caracterizadas quanto a sua morfologia, as três foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão e avaliadas quanto ao perfil de distribuição de tamanho e concentração com o auxílio do equipamento *Nanosight*.

Os resultados demonstraram que os três tipos de NPs possuem morfologia distinta uma da outra (Figura 5.1), conforme anteriormente descrito pelo grupo (Carneiro et al., 2013). Enquanto a GP possui morfologia acicular (Figura 5.1A), a GCD forma agregados esféricos (Figura 5.1B) e a GCM possui um formato que lembra pequenas esferas (Figura 5.1C).

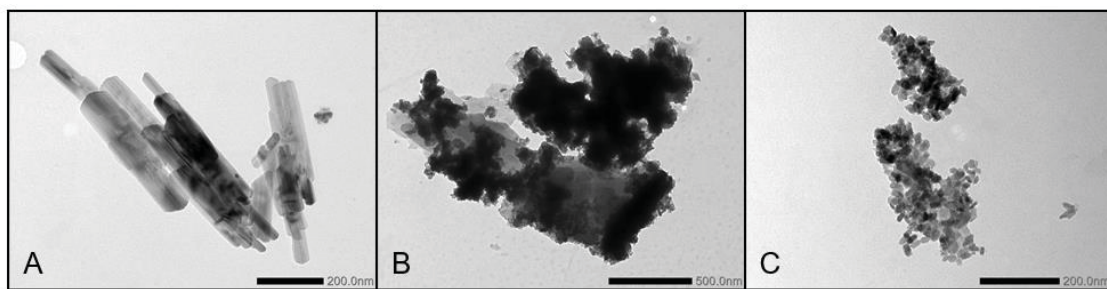


Figura 5. 1: Morfologia de três tipos de FeNPs observada através de MET.

A) GP: Goethita pura; B) GCD: Goethita + cisteína em água destilada; C) GCM: Goethita + cisteína em água do mar.

As NPs de ferro consistem em partículas de grande interesse do ponto de vista industrial uma vez que possuem uma vasta gama de aplicações biomédicas principalmente devido as suas propriedades magnéticas únicas (MALDONADO-CAMARGO, UNNI & RINALDI, 2017). Dentre os três tipos de FeNPs, observou-se que apenas a GCD apresentou propriedades magnéticas, fenômeno constatado na presença de um ímã.

Em relação ao perfil de distribuição de tamanho, observou-se que os três tipos de FeNPs consistem em amostras bastante complexas e heterogêneas, havendo a presença de partículas de diversos tamanhos em cada uma delas (Figura 5.2).

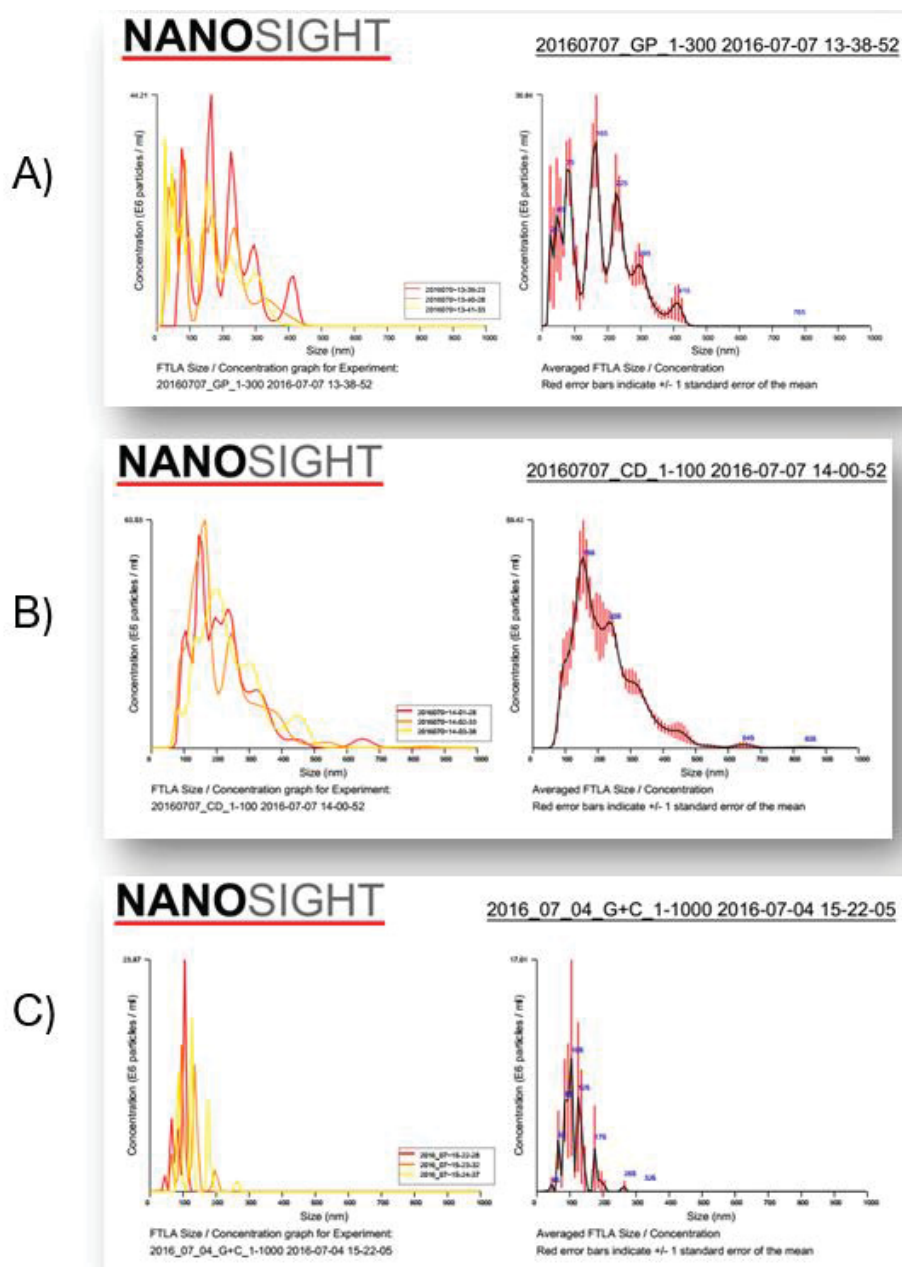


Figura 5. 2: Dispersão de tamanho de três tipos de NPs de ferro observada através do aparelho Nanosight. A) GP: Goethita pura; B) GCD: Goethita + cisteína em água destilada; C) GCM: Goethita + cisteína em água do mar.

Além disso, através do auxílio do equipamento *Nanosight*, as médias de tamanho das três FeNPs foram obtidas (Tabela 5.1).

Nanopartícula	Média de tamanho (nm)	Desvio padrão (nm)
Goethita Pura	107,3	57,7
Goethita + cisteína (água destilada)	222,1	115,5
Goethita + cisteína (água do mar)	108,8	102,7

Tabela 5. 1: Média de tamanho de três tipos de NPs de ferro. A) GP: Goethita pura; B) GCD: Goethita + cisteína em água destilada; C) GCM: Goethita + cisteína em água do mar.

Para dar prosseguimento ao trabalho, uma vez realizada esta caracterização de 1 lote de produção, foram realizadas outras 3 produções subsequentes para caracterização e avaliação da viabilidade e reprodutibilidade do método, resultando em 4 lotes de cada tipo de FeNP. Todos os lotes foram então avaliados quanto a dispersão de tamanho (Tabela 5.2). Este passo é crucial uma vez que para a análise de toxicidade é fundamental que as nanopartículas possuam uma baixa dispersão no que tange o seu tamanho, já que a toxicidade é tamanho-dependente (ISWAYRA et al., 2016; KIM et al., 2015; PAN, BARTNECK & JAHNEN-DECHENT, 2012). Além disso, para que seja viável a avaliação de interação biológica, faz-se mandatória a homogeneidade da dispersão de tamanho das partículas ao longo das produções, não podendo esta variar significativamente de lote a lote.

Através da avaliação da dispersão de tamanho dos três tipos de FeNPs, observamos que elas são de fato compostas por uma população de partículas bastante heterogênea. Observou-se também que apenas alguma população de partículas está na faixa de 1-100 nm, caracterizando-as como nanopartículas.

No entanto, o ponto chave de alerta que foi observado ao longo das caracterizações consistiu no fato de que houve uma heterogeneidade entre as replicatas das FeNPs (Tabela 5.2). Este é o principal fator que inviabiliza a avaliação biológica de citotoxicidade *in vitro*, já que a cada amostra, diferentes graus de toxicidade seriam provavelmente observados. A análise de citotoxicidade é bastante minuciosa e segue uma ordem de critérios previamente estabelecidos pelas agências internacionais regulatórias (ICCVAM, 2006), os quais não permitem principalmente variações intra-amostrais. Portanto, a avaliação da citotoxicidade das FeNP tornou-se inviável.

	Goethita Pura	Goethita + cisteína (água)	Goethita + cisteína (água do mar)
Replicata 1	170,1±99,5 nm	222,1±115,5 nm	108,8±36,3 nm
Replicata 2	131±45,9 nm	137,9±61,5 nm	129±39,8 nm
Replicata 3	144,1±55,8 nm	144,7±50,5 nm	138,6±47 nm
Replicata 4	148,3±50,3 nm	131,6±51,9 nm	130,3±47,9 nm

Tabela 5. 2: Avaliação de tamanho de NP de ferro. Valores expressos como média \pm desvio padrão.

5.1.2.2 Nanopartículas de Ouro

As NPs de ouro foram sintetizadas por meio de síntese física através de ablação por raio laser e cedidas pelo grupo do Dr. Arandi Bezerra Ginane Junior. Estas NPs foram caracterizadas quanto ao seu tamanho através de DLS e sua concentração calculada através de espectrofotometria (Figura 5.3). Observou-se que a distribuição de tamanho destas NPs concentrou-se na faixa de 1-2 nm (Figura 5.3 A) e com o pico de absorção na faixa dos 525 nm, condizendo com o pico característico do ouro (Figura 5.3 B). Da mesma forma, através de espectrofotometria, foi constatada que a concentração da amostra foi de 0,2 mg/ml (Figura 5.3 C).

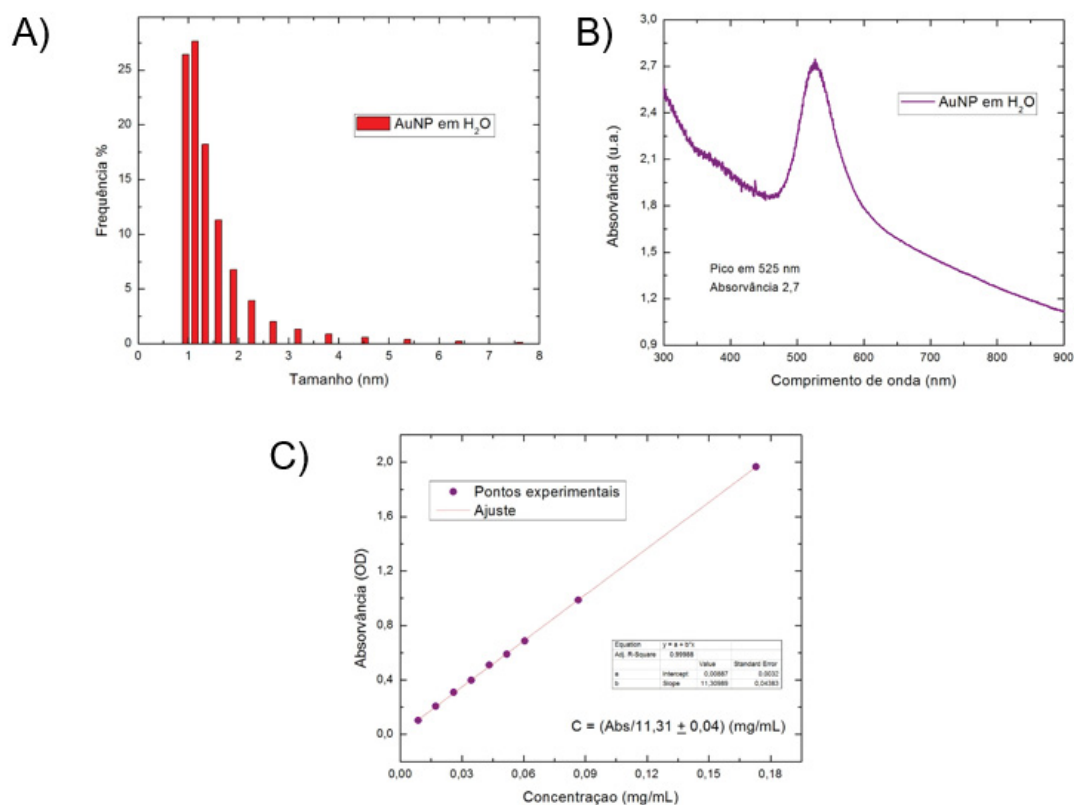


Figura 5. 3: Caracterização das NPs de ouro. A) Análise da dispersão de tamanho das NPs de ouro através de DLS; B e C) Avaliação espectrofotométrica da amostra.

Conforme metodologia recomendada por órgãos internacionais (OECD, 2010) e já estabelecida em nosso grupo (ABUD et al., 2015), foi realizada a

avaliação da citotoxicidade das AuNPs em células BALB/c 3T3 através do ensaio de captação do vermelho neutro. Através desta análise, torna-se possível realizar o cálculo dos valores dos ICs (IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀) e a predição de DL₅₀, bem como a classe de toxicidade GHS. Para as AuNPs, dois ensaios foram validados obedecendo aos critérios da OECD *Guideline* 129. Através destes ensaios, foi possível obter os seguintes valores de IC₅₀: 67,23 µg/ml (exp 3 – Replicata 1) e 64,25 µg/ml (exp7 – Replicata 2) (Figura 5.4).

Como uma primeira aproximação, os valores de IC₅₀ foram utilizados para a predição da DL₅₀ ($\log IC_{50} = \log EC_{50} - (\log(\text{Top-Bottom})/Y\text{-Bottom}) - 1/\text{HillSlope}$) e a classe de toxicidade. Os valores de DL₅₀ calculados foram: 505,12 mg/kg (exp 3 - Replicata 1) e 508,59 mg/kg (exp 7 – Replicata 2), sugerindo que estas NPs enquadrem-se dentro da classe 4 de toxicidade GHS (300-2000 mg/kg) (Figura 5.4).

Para a avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas AuNPs providas do mesmo lote de produção. Uma vez que este primeiro lote se esgotou, e com o objetivo de dar continuidade ao trabalho com um número de replicatas suficientes (mínimo de 3) para análise estatística, um novo lote de AuNPs foi produzido. No entanto, a partir desta produção, as AuNPs passaram a precipitar nas placas, gerando desvios padrões incompatíveis de acordo com a OECD *Guideline* 129 ($\geq 15\%$). Sendo assim, não foi possível obter uma triplicata do ensaio de citotoxicidade das AuNPs, inviabilizando as avaliações com esse tipo de NP, uma vez que a etapa crucial do trabalho consiste na obtenção das concentrações de IC₅₀.

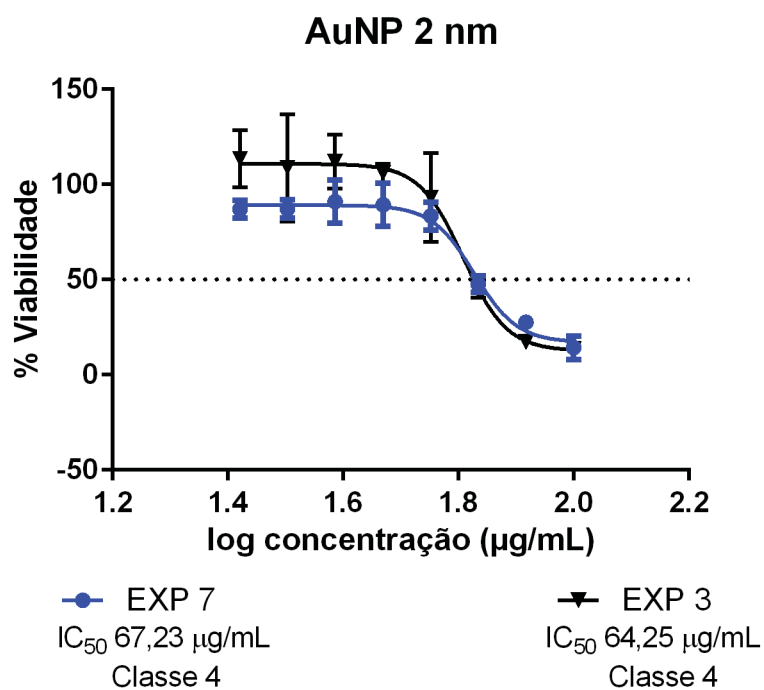


Figura 5. 4: Viabilidade celular relativa de células BALB/c 3T3 após o tratamento com NPs de ouro. Indicado abaixo do gráfico, encontra-se o valor de IC₅₀ calculado após a obtenção da curva (n=2) e a classe de toxicidade.

Portanto, devido a heterogeneidade na dispersão de tamanho das FeNPs ao longo das produções e a instabilidade das AuNPs, as avaliações biológicas destas NPs com as células BALB/c 3T3 foram descontinuadas.

6 CAPÍTULO II

Artigo

Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3

Situação – Publicado na revista *Toxicology in vitro* (dezembro de 2018)

Prefácio

Este capítulo apresenta o artigo publicado na revista *Toxicology in vitro*, que descreve a produção, caracterização de BiNPs produzidas através de ablação a laser, assim como a avaliação da citotoxicidade, interação e morte celular de BiNPs com células BALB/c 3T3. Tais abordagens compunham os objetivos específicos desta Tese.

Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3

doi: 10.1016/j.tiv.2018.07.003

Thamile Luciane Reus¹, Thiago Neves Machado², Arandi Ginane Bezerra Jr²,
Bruna Hilzengeder Marcon¹, Ariane Caroline Paschoal Campos¹, Crisciele
Kuligovski¹, Alessandra Melo de Aguiar^{1*}, Bruno Dallagiovanna^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ Paraná, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.

² Laboratório FOTONANOBIÓ, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Avenida 7 de Setembro 3165, 80230-901, Curitiba, PR, Brazil.

* Corresponding authors at: Instituto Carlos Chagas, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, FIOCRUZ Paraná, 3775, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.

E-mail addresses: *thamilelreus@gmail.com* (Thamile Luciane Reus), *thiagomachado@alunos.utfpr.edu.br* (Thiago Neves Machado), *arandigbj@gmail.com* (Arandi Ginane Bezerra Jr), *bruna.marcon@fiocruz.br* (Bruna H. Marcon), *arianepaschoal@hotmail.com* (Ariane Caroline Paschoal Campos), *criscielek@yahoo.com.br* (Crisciele Kuligovski), *alessandra.aguiar@fiocruz.br* (Alessandra Melo de Aguiar), *bruno.dallagiovanna@fiocruz.br* (Bruno Dallagiovanna).

6.1.1 HIGHLIGHTS:

- BiNPs covered by protein coronas seem to present higher stability;
- BiNPs covered with culture medium or BSA present the same cytotoxicity;
- Higher concentrations of BiNPs cause cell death mediated by apoptosis in 24 hours;
- BiNPs are uptaken by cells, leading to cell damage at the ultrastructural level;

6.1.2 ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) have emerged as new potential tools for many applications in previous years. Among all types of NPs, bismuth NPs (BiNPs) have a very low cost and potential for many applications, ranging from medicine to industry. Although the toxic effects of bismuth have been studied, little is known about its toxicity at the nanoscale level. Therefore, in this study, we aimed to investigate the cytotoxic effects of BiNPs produced by laser ablation synthesis in solution (LASiS) in a reference mammalian cell line to evaluate their cytotoxicity (BALB/c 3T3 cells). We also stabilized BiNPs in two different solutions: culture medium supplemented with fetal bovine serum (FBS) and bovine serum albumin (BSA). The cytotoxicity of BiNPs in culture medium (IC_{50} : 28.51 ± 9.96 $\mu\text{g/ml}$) and in BSA (IC_{50} : 25.54 ± 8.37 $\mu\text{g/ml}$) was assessed, and they were not significantly different. Second, the LD_{50} was predicted, and BiNPs were estimated as GHS class 4. We also found that cell death occurs due to apoptosis. By evaluating the interaction between BiNPs and cells at ultrastructural level, we suggest that cell death occurs once BiNPs are internalized. Additionally, we suggest that BiNPs cause cell damage because myelin figures were found inside cells that had internalized BiNPs. To date, this is the first study to assess the cytotoxicity of BiNPs produced by LASiS and to predict the possible LD_{50} and GHS class of BiNPs.

Key-words: BiNP, cytotoxicity, 3T3, nanotoxicology

6.1.3 INTRODUCTION

Nanoparticles (NPs) have become promising tools for many purposes, including medical diagnostics and therapeutics (Azhdarzadeh et al., 2015). NPs have a high surface-area-to-volume ratio; thus, they might pass through cell membranes, which can be responsible for creating adverse interactions (Nath Roy et al., 2016). Thus, it is very important to understand the interactions between NPs and cells in order to explore the biomedical applications of NPs, especially for drug delivery. This is crucial for designing NPs that are efficient, safe, reliable and nontoxic (Adjei et al., 2014; Azhdarzadeh et al., 2015). Because human and environmental exposure to NPs is inevitable, nanotoxicology research has gained more attention (Lewinski et al., 2008).

Among all types of nanoparticles, bismuth nanoparticles (BiNPs) have been evaluated for their use in several different fields. These particles have many medicinal properties, such as bactericidal, antibiofilm, fungicidal and antiviral activity; thus, BiNPs have been evaluated for their use in oral antiseptics (Hernandez-Delgadillo et al., 2013; Claudio & Chellam, 2014; El-batal et al., 2017; Hernandez-Delgadillo et al., 2017). They have also been evaluated for thermo-chemotherapy, imaging (Li et al., 2016; Liu et al., 2015; Swy et al., 2014; Veintemillas-Verdaguer et al., 2015) and as a radiosensitizing agent for X-ray radiation therapy (Stewart et al., 2016). Regarding industrial applications, they are very attractive due to their low cost compared with other metal nanoparticles (Claudio & Chellam, 2014). Bismuth-based compounds have been widely used for industrial, cosmetic and medical purposes. However, little is known about their toxicity at the nanoscale level (Abudayyak et al., 2017).

So far, no products using bismuth nanoparticles have been commercialized (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2018), thus, evaluating the toxicity mechanisms of BiNPs is a crucial step before they are applied in biomedicine. For the toxicity assessment of NPs, *in vitro* assays can be used; these assays have many advantages because they are fast, cheap, convenient and are associated with fewer ethical issues (Fard et al., 2015). Among all the *in vitro* methods recognized by regulatory agencies, cell lines such as BALB/c 3T3 (murine fibroblast) or NHK (normal human keratinocytes) are well-known cell substrates for use in *in vitro* cytotoxicity testing (OECD, 2010). BALB/c 3T3 cells are recommended for estimating *in vivo* starting doses for acute toxicity (ICCVAM, 2001). Acute toxicity data are required under regulatory frameworks in order to provide classification and labelling warning or even the possible consequence after exposure to substances such as industrial chemicals, biocides, pesticides, cosmetic ingredients and pharmaceuticals (ECCVAM, 2018). Acute oral toxicity testing is typically the first step for the identification and characterization of the hazards caused by chemicals (ICCVAM, 2001). Also, acute systemic toxicity testing is conducted in order to determine the relative health hazard of chemicals or products. All substances that are found to cause death in animals at or below prescribed doses have to be labeled to identify the hazard potential (ICCVAM, 2001). Thus, the evaluation of the oral systemic toxicity is very recommended for any type of substance that is going to be used for health purposes, such as BiNPs. In this study, we aimed to assess the cytotoxicity of BiNPs using a reference cell line (3T3 cells) for toxicity evaluation and a validated methodology (OECD guideline no. 129) (OECD, 2010).

6.1.4 METHODS

6.1.4.1 *Synthesis and characterization of BiNPs*

BiNPs were synthesized by laser ablation synthesis in solution (LASiS). Bismuth high-purity pellet targets (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; CAS number: 7440-69-9) immersed in 5 mL of distilled water were irradiated with the fundamental harmonic of an Nd: YAG Laser (Quantronix, Hauppauge, NY, USA; model 4117) operating at 1064 nm, Q-switched at 1.5 KHz, delivering pulses of 200 ns. A 5-cm focal lens was used to concentrate the laser beam on the Bi target for 3 min. Mass measurements gave a Bi ablation rate of 2 mg/min under the above conditions.

Because BiNPs in water tend to aggregate and precipitate within 1-3 hours after synthesis, we stabilized them by two different approaches. First, BiNPs were stabilized by the addition of complete culture media: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). However, because FBS has a very heterogeneous composition that might change from batch to batch (Coecke et al., 2005), we decided to add a more homogeneous solution of proteins. Therefore, we added 15 μ L of Bovine Serum Albumin (BSA) (Affymetrix/USB/ThermoFisher, Waltham, MA, USA) (final concentration of BSA:0.05%) to another set of newly synthesized BiNPs to stabilize the nanoparticles.

Saturated brownish colloidal suspensions of BiNPs were then characterized by UV/vis spectroscopy (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA; Model USB2000+ spectrometer from 200 to 1000 nm; operating software Spectrasuite

6.1), dynamic light scattering (DLS) (Microtrac, Largo, FL, USA; Nanotrac Ultra model, operating software FLEX application 10.6.0), transmission electron microscopy (TEM) (Jeol JEM1400-Plus, Tokyo, Japan) and the zeta potential (Litesizer 500; Anton Paar, Graz, Austria).

6.1.4.2 Cell culture

Skin fibroblasts from murine embryo BALB/c mice 3T3 NIH Clone A31 cells (3T3 cells) (Rio de Janeiro Cell Bank – BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were cultured according to datasheet instructions. They were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA). These cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. For the neutral red uptake assay (96-well plate) (ICCVAM, 2006), TUNEL assay (96-well plate) and cell-NP interaction assay (6-well plate), 2.5x10⁴ cells/ml were plated.

6.1.4.3 Cytotoxicity evaluation by neutral red uptake

Briefly, cells were seeded into 96-well plates at a concentration of 2.5x10⁴ cells/ml (100 µl/well) and cultured as described above overnight. Then, BiNPs were diluted and prepared according to ICCVAM recommendations (ICCVAM, 2006b). Eight serial dilutions of BiNPs ranging from 0.94-200 µg/ml were prepared in DMEM supplemented with 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 200 IU/ml penicillin and 0.2 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and applied to culture plates for 48 hours. For the serial dilution, the log-factor of 2.15 was used (ICCVAM, 2006c).

To evaluate cytotoxicity, the neutral red uptake (NRU) assay was performed (ICCVAM, 2006c). NRU is a quantitative cell viability assay recommended by OECD (OECD, 2010) to determine the initial estimated doses for acute oral toxicity. For every assay, a positive control of SDS was included, and the assay was considered valid only when in accordance with ICCVAM guidelines (ICCVAM, 2006c).

After 48 hours of incubation, the medium was discharged, and cells were washed with D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). Cells were stained with 25 µg/ml neutral red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in DMEM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) supplemented 5% with fetal bovine serum (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and 100 IU/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Next, the plates were incubated at 37°C for 3 hours. Next, the wells were rinsed with D-PBS, and neutral red incorporated by cells was extracted with a solution composed of 50% ethanol and 1% acetic acid (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA). The plates were then shaken for 20-45 min. Finally, the optical density of the samples was measured at 540 nm using a Synergy H1 Multi-Mode reader (Biotek, Winooski, Vermont, USA).

The acceptance criteria described in the BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method by ICCVAM (Test Acceptance Criteria for Positive Control and Test Acceptance Criteria for Positive Control and Test Acceptance Criteria for Test Substances) were considered for all tests (ICCVAM, 2006c).

Finally, the data were analyzed according to ICCVAM recommendations and the values of IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ and the prediction of LD₅₀ were performed

(OECD, 2010; ICCVAM, 2006c; ICCVAM, 2006e; Scanu et al., 2011; Abud et al., 2015). Briefly, data were analyzed in Microsoft Office Excel in order to determine cell viability. Data were converted into a percentage of the control. In order to calculate IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values, data were transferred to GraphPad Prism® 6.0 to apply a Sigmoidal dose-response (variable slope) with four parameters. The parameters were then used with rearranged Hill Function. Outliers were analyzed using Grubbs test (available online in <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). IC₅₀ was also used to predict LD₅₀ and GHS class for test substances. The IC₅₀ geometric mean was used to predict the LD₅₀ by RC-rat only weight regression using the formula $\log \text{LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml}) + 2.024$ ($R^2 = 0.325$). Once LD₅₀ was calculated, it was possible to predict GHS class for BiNPs.

6.1.4.4 Apoptosis evaluation by the TUNEL Assay

To assess whether the cell death mechanism was apoptosis, the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay was performed. TUNEL detects apoptotic cells that have undergone DNA degradation in the late stages of apoptosis (Kyrylkova et al., 2012).

For this assay, cells were seeded into 96-well plates at a concentration of 2.5×10^4 cells/ml (100 μl /well) and cultured as described above for 24 hours. Then, BiNPs were immediately solubilized in culture medium, and IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ concentrations were applied to cell culture plates. After 24 hours, the medium with BiNPs was discarded, and the cells were washed once with PBS and fixed with paraformaldehyde 4% for 15 min.

Therefore, after fixation, the TUNEL assay was performed according to the manufacturer's instructions (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay - ThermoFisher, Waltham, MA, USA), and nuclei were stained with Hoechst (included in the kit). Cells were then photographed with the LEICA DMI6000B (Leica, Wetzlar, Germany) fluorescence microscope. For each condition, 4 wells were used, and 5 pictures of each well were taken. For the nuclei count, ImageJ version 1.45d (NIH Image) was used. For the quantification of positive cells, a positive control (DNase) included in the kit was set as a model for positive staining. Also, for this assay, three independent assays were performed.

6.1.4.5 Evaluation of 3T3 cells and BiNP interaction by transmission electron microscopy (TEM)

To evaluate the interaction between BiNPs and 3T3 cells, transmission electron microscopy (TEM) was performed. Briefly, 2.5×10^4 cells/ml (2 ml/well) were plated, and, after 24 hours, BiNPs were added at 2 different concentrations: IC₅₀ concentration (28.51 µg/ml) and a non-toxic concentration (2.02 µg/ml) in which cells remained 100% viable (2.02 µg/ml). After 48 hours, the medium with BiNPs was discharged, and the cells were washed 5 times with PBS and then fixed for 24 hours in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, washed and kept in sodium cacodylate buffer overnight at 4°C. Cells were scraped and transferred into a microtube. Samples were post-fixed with solution containing 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide, 5 mM calcium chloride and 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1 hour at room temperature, washed and dehydrated in a graded acetone series (10 min incubation). Next, samples were infiltrated overnight with 1:1 solution of acetone and PolyBed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA, USA) and then were embedded for 6 hours

with pure resin. Samples were polymerized for 72 hours at 60°C. Ultrathin sections were obtained using a Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica, Wetzlar, Germany). Samples were contrast-stained with 5% uranyl acetate for 30 min and with lead citrate for 5 min. Analysis was performed using a Jeol JEM1400-Plus transmission electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan).

6.1.4.6 Statistical analysis

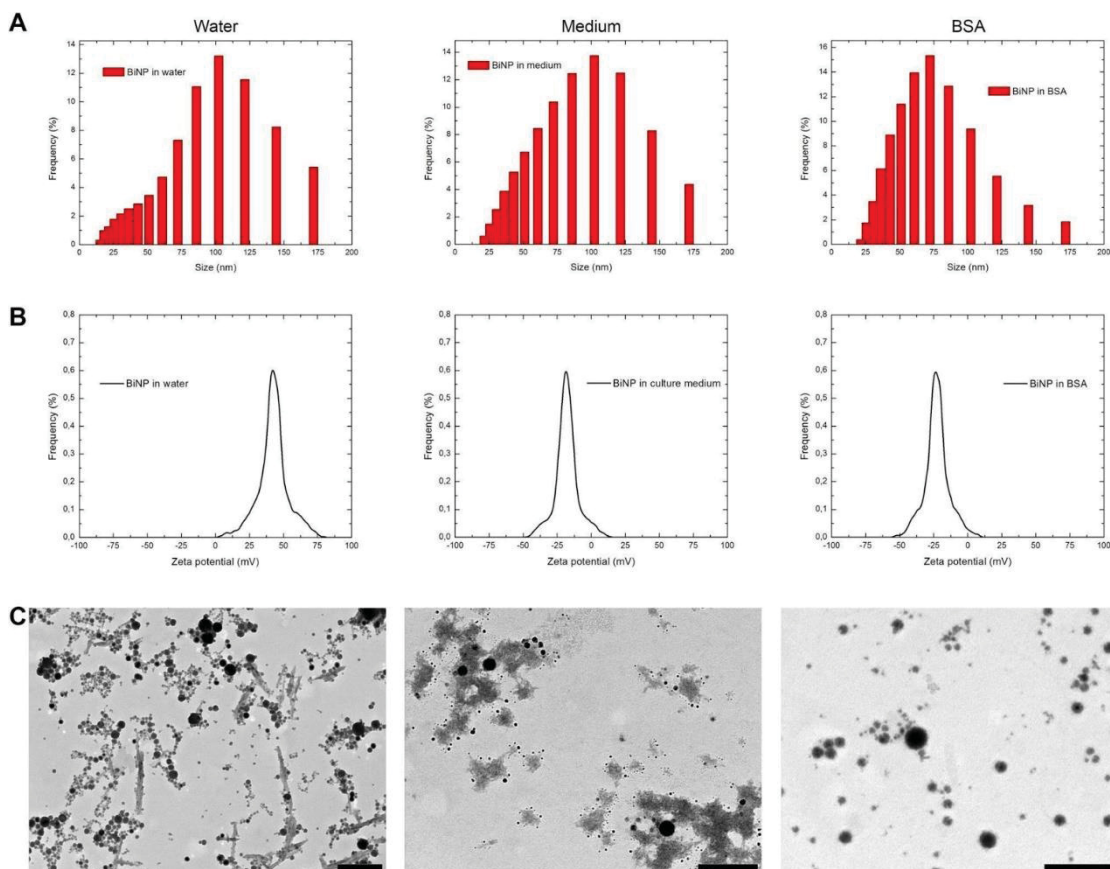
Data were expressed as the means \pm standard deviation (SD). To compare IC values between both BiNPs solutions, one-way ANOVA and Tukey's post test was used. For the TUNEL assay, the differences between all groups was calculated by one-way ANOVA and Dunnett's post test using GraphPad Prism® 6.0. *p* values less than 0.05 were considered significant.

6.1.5 RESULTS

6.1.5.1 *BiNPs are round shaped and heterogeneous in size*

BiNPs were synthesized by laser ablation synthesis in solution (LASiS), a green technique that gives access to the preparation of diverse nanomaterials in pure solvents, independent from chemical precursors, avoiding the use of toxic substances (Barcikowski & Compagnini, 2013). The first step after NP synthesis was its physico-chemical characterization. The nanoparticles present a distinct plasmon peak at 250 nm (Figure S1) that is characteristic of metallic BiNPs, in accordance with the XRD data (Rosa et al., 2014).

The particle size, size distribution, zeta potential and particle morphology of BiNPs were then assessed for BiNPs in water only or being submitted to stabilization by the corona effect (in medium or BSA) (Figure 1).



BiNPs paper - Figure 1: BiNPs synthesized by LASis are round shaped and heterogeneous in size. After BiNP synthesis, physicochemical characterization was performed. A) Average particle size and size distribution measured by DLS of BiNPs in water, medium and BSA. B) Zeta potential of BiNPs in water, medium and BSA. C) Particle morphology, as assessed by TEM of BiNPs in water, medium and BSA. According to TEM, nanoparticle average size was 19.97 nm with 10.46 nm size dispersion. Scale bar = 200 nm.

BiNPs newly synthesized by laser ablation in water were at a concentration of 0.4 mg/ml (Figure S1) and had an average size of 47 nm (Figure 1A) and zeta potential of 39.1 mV (Figure 1B). An average DLS experiment can be performed in a couple of minutes, therefore, it constitutes a powerful technique for LASis quality control, especially when combined with UV-Vis. Care was taken so that all synthesized nanoparticles had exactly the same DLS and UV-Vis features; therefore, the nanoparticles used in all experiments were equivalent in concentration, size, and size dispersion. Regarding their morphology, they were heterogeneous and mostly rounded in shape, as demonstrated by TEM (Figure 1C). Because these particles did not remain stable for more than 2 hours, we stabilized them by adding proteins to them to form a protein-NP corona (Lundqvist et al., 2008; Monopoli et al., 2013; Rahman et al., 2013; Treuel et al., 2015).

First, BiNPs were resuspended in culture medium with FBS. These NPs had an average size of 52 nm (Figure 1A) and a mean zeta potential of -20.2 mV (Figure 1B). TEM demonstrated that they were also rounded in shape and had an amorphous material, probably proteins, around them, possibly due to the corona NP-protein (Figure 1C).

Second, BiNPs were resuspended in 0.05% BSA. These NPs had an average size of 49 nm (Figure 1A) and a zeta potential of -23.8 mV (Figure 1B). This zeta potential is compatible with that described for BSA (Böhme & Scheler, 2006). Additionally, TEM, demonstrated that they were heterogeneous and

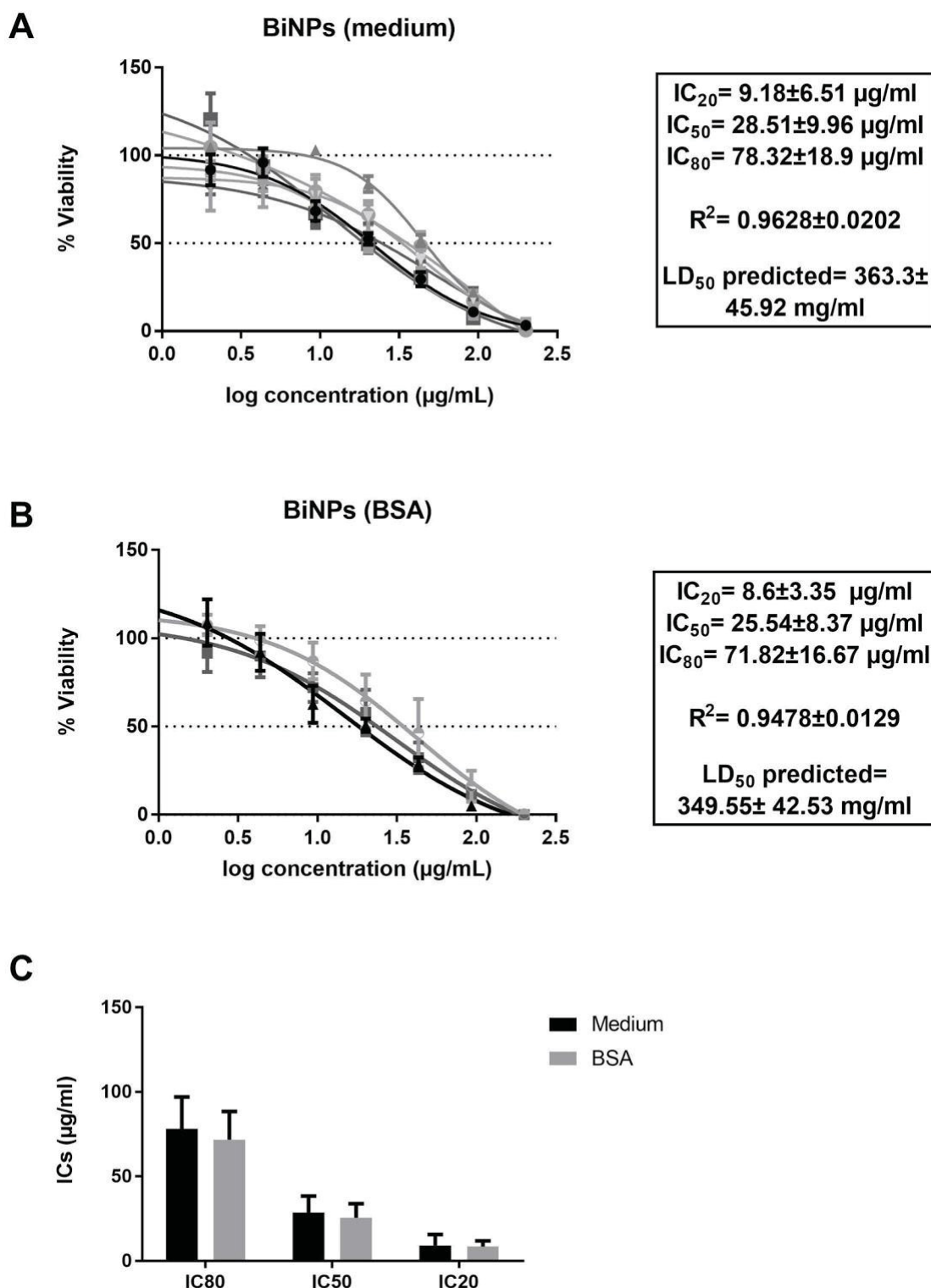
rounded in shape (Figure 1C). Our next step was to investigate the cytotoxicity of BiNPs stabilized with either medium or BSA.

6.1.5.2 *BiNPs in medium or BSA present the same cytotoxicity*

The cytotoxicity of BiNPs in medium was evaluated at concentrations ranging from 0.94 to 200 $\mu\text{g/ml}$ (dilution log factor: 2.15). The IC values obtained were as follows: $\text{IC}_{20}=9.18\pm6.51$ $\mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50}=28.51\pm9.96$ $\mu\text{g/ml}$ and $\text{IC}_{80}=78.32\pm18.90$ $\mu\text{g/ml}$. Additionally, the predicted LD_{50} was 363.3 ± 45.92 mg/kg , suggesting that BiNPs in medium with FBS might belong to the GHS class 4 for acute toxicity (Figure 2A; Table S1).

The cytotoxicity of BiNPs with BSA was also evaluated. In this case, the ICs values were as follows: $\text{IC}_{20}=71.82\pm16.67$ $\mu\text{g/ml}$, $\text{IC}_{50}=25.54\pm8.37$ $\mu\text{g/ml}$, and $\text{IC}_{80}=8.6\pm3.35$ $\mu\text{g/ml}$. Additionally, the predicted LD_{50} was 349.55 ± 42.53 mg/kg , classifying BiNPs with the BSA corona as a class 4 compound (Figure 2B; Table S2).

When the comparison between those ICs values is made for the cytotoxicity of BiNPs in medium or BSA, no significant differences were found between them (Figure 2C), indicating that the corona composition does not affect the cytotoxicity of BiNPs. Thus, for subsequent evaluations, BiNPs in medium were used.



BiNPs paper - Figure 2: The cytotoxicity of BiNPs in medium and BSA is not different. The cytotoxicity of BiNPs was assessed by the neutral red uptake assay. Murine BALB/c 3T3 clone A31 cells were treated for 48 hours with different BiNP dilutions (in medium and BSA) and then were incubated with neutral red solution for 3 hours. A dose-response curve that fit the Hill function was obtained for each experiment. LD_{50} value was calculated using the following formula: $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ ($R^2 = 0.325$). A) Cytotoxicity of BiNPs in medium: Hill function curve, IC values, LD_{50} and R^2 for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in medium.

Values are expressed as the means \pm standard deviation (n=7). B) Cytotoxicity of BiNPs in BSA: Hill function curve, IC values, LD₅₀ and R² for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in BSA. Values are expressed as the means \pm standard deviation (n=3); C) Comparison of IC values for BiNPs in medium and BSA. No significant difference was found between the IC values.

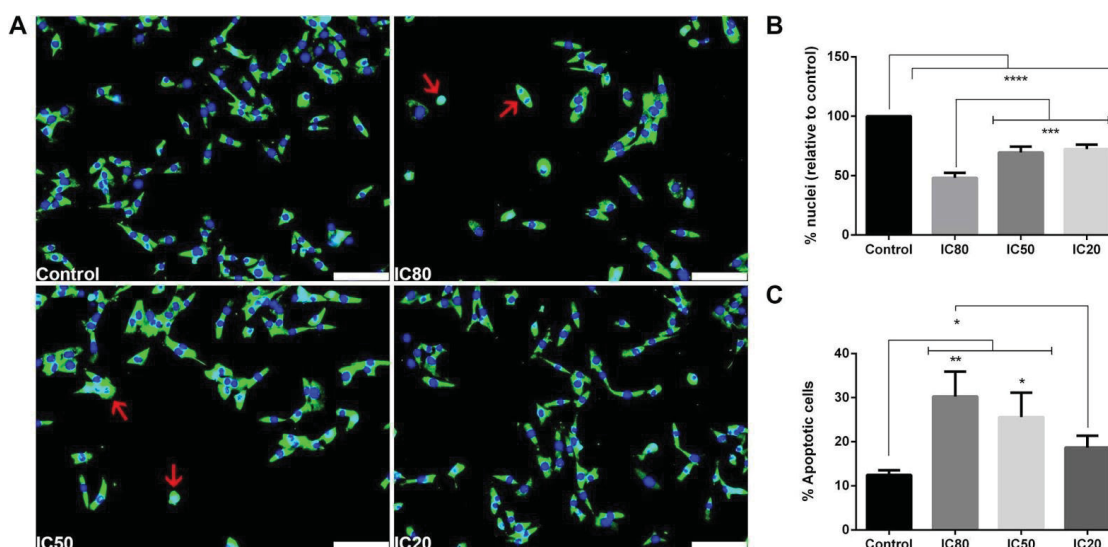
6.1.5.3 Cell death caused by BiNPs is mediated by apoptosis

Once a dose-response effect of BiNPs on the relative cell viability could be evaluated by the neutral red-uptake assay, our next aim was to investigate the mechanism involved in the reduction of cell viability or cell death.

To that end, the TUNEL assay was performed. Thus, we could quantify the percentage of apoptotic cells after 24 hours of incubation with BiNPs.

The percentage of apoptotic cells were as follows: control (no BiNPs exposure)=12.46 \pm 1.08; IC₂₀=18,68 \pm 2.66, IC₅₀=25.57 \pm 5.53, and IC₈₀=30.26. Thus, the percentage of apoptotic cells was significantly higher in cells cultivated with IC₈₀ (243%) and IC₅₀ (205%) concentrations of BiNPs than in cells with no BiNPs exposure (control) (Figure 3C), suggesting a dose-response phenomenon.

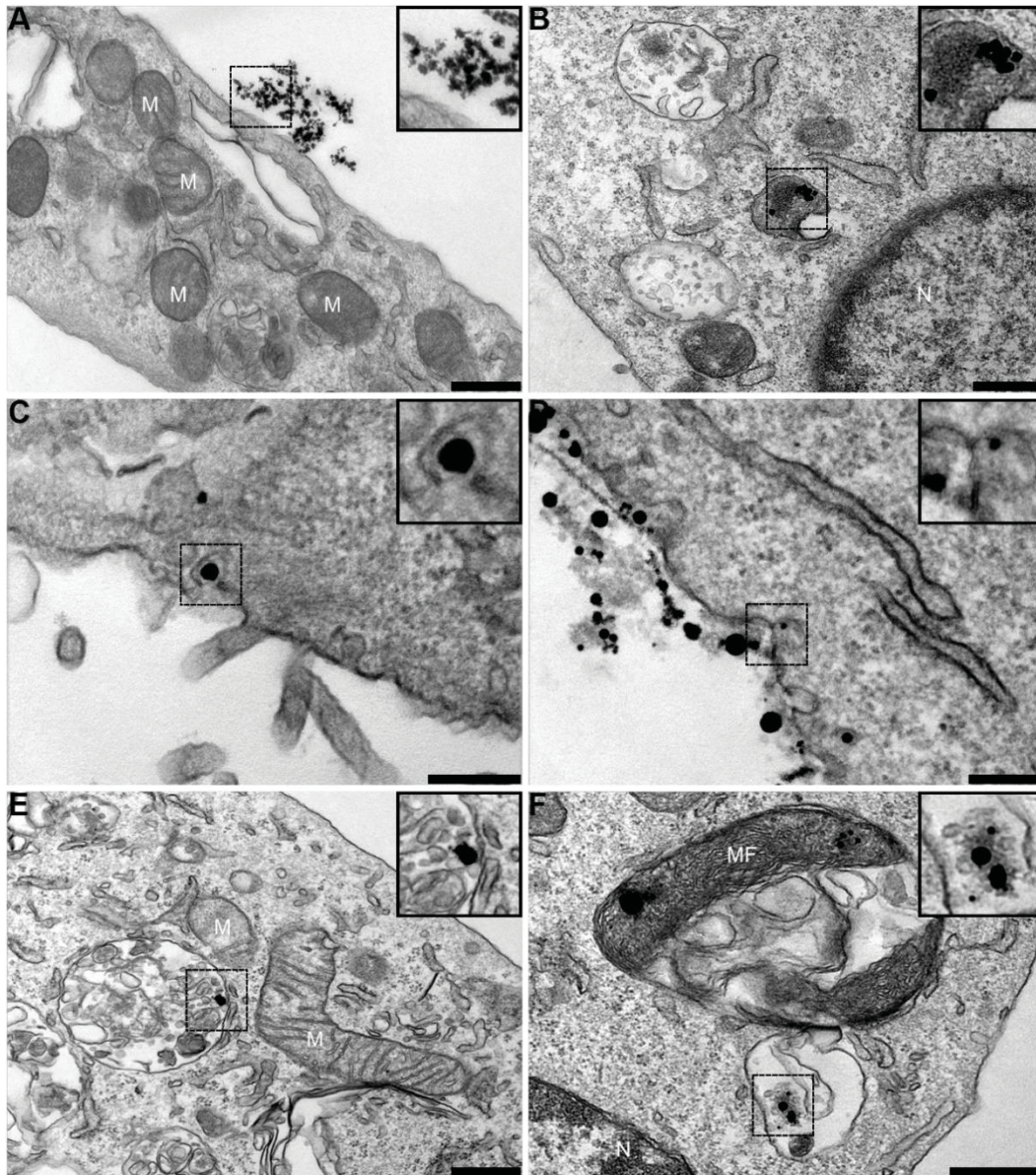
Furthermore, using the TUNEL assay, we could observe the cell morphology and quantify the number of nuclei. Cell morphology was clearly affected after incubation with BiNPs. At the highest concentration, cells looked smaller, possibly indicating a cell death process (Figure 3A). Additionally, we quantified the nuclei in order to estimate the number of cells after BiNPs exposure. The percentage of nuclei relative to control (100%) were as follows: IC₂₀=72.36 \pm 3.85, IC₅₀=69.45 \pm 4.96, and IC₈₀=48.09 \pm 4.32. Our results demonstrated that, as the concentration of BiNPs increases, the number of nuclei decreases due to cell death (IC₂₀=27.64%, IC₅₀=30.55%, and IC₈₀=51.91%) (Figure 3B), possibly by apoptosis.



BiNPs paper - Figure 3: BiNPs induce cell death in 3T3 cells in a dose-dependent manner. 3T3 cells were exposed to IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ concentrations of BiNPs for 24 h and then were assessed by TUNEL staining (green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). A) Red arrows indicate representative positive cells with a different morphology than control cells. Images were acquired at 40X magnification. Sixteen images were acquired for each condition, and the number of nuclei and positive cells was quantified (three independent experiments). B) Number of nuclei assessed by Hoechst staining. C) Percentage of apoptotic cells. Values are expressed as a percentage of the positive cells out of the total number of cells. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$; ****: $p < 0.001$.

6.1.5.4 BiNP uptake induce ultrastructure cell alteration

Finally, we investigated how BiNPs interacted with 3T3 cells at the ultrastructural level. When a non-cytotoxic concentration was used, BiNPs were found around the cells (Figure 4A) and seldom inside of them (Figure 4B), suggesting that, at a low concentration, these nanoparticles are rarely internalized by the cell. No evidence of cell alteration at the ultrastructural level was detected for the non-cytotoxic concentration. In contrast, when IC₅₀ was used, BiNP internalization by 3T3 cells was observed (Figure 4C and D). BiNPs were found inside cytoplasmic vacuole-like structures (Figure 4E). Some of these structures have myelin figure features (Figure 4F), the presence of which is a sign of cell damage.



BiNPs paper - Figure 4: BiNPs become cytotoxic once they are internalized by cells. When a non-cytotoxic dose was used, nanoparticles were found mostly outside of the cells (A) and rarely inside (B). When the IC₅₀ dose was applied, nanoparticles were observed close and inside the invagination areas of the membrane (C, D). Nanoparticles were also found within cytoplasmic vesicles (E) or myelin figures (F), indicating that BiNPs alter the cell ultrastructure when they are internalized. Scale bar = 500 nm in A, B, E and F. Scale bar = 200 nm in C and D. M = mitochondria; MF = myelin figure; N = nucleus.

6.1.6 DISCUSSION

Nanoparticles have emerged as new promising tools in medicine. However, more information regarding their toxicity potential and mechanisms is required. Understanding the interaction between NPs and biological systems is a key factor for safe and efficient application (Rahman et al., 2013).

There are only a few studies regarding bismuth nanoparticles toxicity. It is important to point out that most of them have used bismuth oxide NPs (Abudayyak et al., 2017; Hernandez-Delgadillo et al., 2013; Liman, 2013) or even bismuth ferrite NPs (Staedler et al., 2015). Also, most of them have used chemically produced NPs. Chemical synthesis can lead to impurities of the nanoparticle colloid. Physical synthesis is an efficient method to generate nanoparticles in a scalable and clean manner (Barcikowski & Compagnini, 2013). Throughout this study, we showed that BiNPs produced by LASiS are round shaped and heterogeneous in size. These NPs become stable once they are covered by a protein corona, as we have seen with FBS proteins (culture medium) and BSA. The protein corona is essential for studies where NPs-cells interaction is investigated, once it mimics what occurs in biological milieu (Lundqvist et al., 2008; Truel et al., 2015). Also, it has been shown that many characteristics of NPs can be affected by the presence of inorganic or biological moieties and this might be the reason why many studies have different conclusions concerning the same material. Thus, pre-incubating NPs with proteins can control the composition of the bio-nano-composite, which is essential for its industrial and biomedical applications (Izak-Nau et al., 2013).

Other studies with chemically synthesized BiNPs have shown cytotoxic and genotoxic effects on different cell lines (Hernandez-Delgadillo et al., 2013;

Staedler et al., 2015; Abudayyak et al., 2017; Liu et al., 2017). However, none of them have used recommended cell lines for toxicity prediction or even reported the GHS class of BiNPs. In our study, we used BALB/c 3T3 cells, a reference cell line used for *in vitro* cytotoxicity to estimate the starting doses for acute oral systemic toxicity tests (ICCVAM, 2006c). This cell line has been widely used for toxicity evaluations (Thorne et al., 2014; Abud et al., 2015; Hrouzek et al., 2016), even for NP cytotoxicity evaluation (Mannerström et al., 2016; Stoccoro et al., 2016; Uboldi et al., 2016). Previous studies have shown that BALB/c 3T3 cells are more precise in regard to toxicity evaluation than are other cell lines, such as Caco-2, HepaRG, HepG2, HeLa and hepatocytes (Broeders et al., 2013; Hrouzek et al., 2016). Both Broeders et al. (2013) and Hrouzek et al. (2016) compared 3T3 cells with other cell lines for cytotoxicity evaluation and observed that these cells were more sensitive and accurate for *in vitro* cytotoxicity evaluation. By cell viability evaluation, we demonstrated the concentrations that led to the death of 20% (IC_{20}), 50% (IC_{50}) and 80% (IC_{80}) of the cells. Other studies have also demonstrated the toxic concentrations of bismuth-nano-composites, however, it is important to notice that all those NPs evaluated before were chemically produced. Abudayyak et al. (2017) showed IC_{50} values of Bi_2O_3 NPs ranging from 35.11 to 96.55 $\mu\text{g/ml}$ in other cell lines, while Liu et al. (2017) showed that the viability of A549 and HEK293 cells was decreased when cells were exposed to 160 $\mu\text{g/ml}$ of BiNPs.

Based on other studies (Scanu et al., 2011; Abud et al., 2015) and on OECD (2010) recommendations, we also predicted LD_{50} . This value allows a substance to be ranked and classified according to the Globally Harmonised System (GHS) for the classification of chemicals that cause acute toxicity. GHS

organizes the hazard characteristics of substances based on “hazard classes” according to the severity of the hazard. The GHS has five categories for acute toxicity, according to the LD₅₀ value of the chemical (US EPA, 2004). By having the LD₅₀ value, we were able to predict BiNPs as GHS class 4 for estimating *in vivo* starting doses for acute toxicity (ICCVAM, 2001). The GHS for acute toxicity indicates that a class 4 substance has an LD₅₀ from 300 to 2000 mg/kg. Category 4 substances are classified as harmful, but not fatal or toxic (UN, 2011), such as propranolol HCl and sodium dodecyl sulfate (SDS) (Scanu et al., 2011, Abud et al., 2015). It is also very important to note that other studies have shown that bismuth is less toxic than BiNPs. Sano et al. (2005) demonstrated that bismuth has an LD₅₀ dosage greater than 2000 mg/kg in single and 28-day repeated administration studies. They also concluded that the adverse toxic effects of bismuth as a simple metal substance are low. According to the MSDS of the bismuth target used in this study, bismuth is not considered harmful or dangerous (Sigma-Aldrich, 2017). Therefore, the pharmacokinetics and pharmacodynamics of BiNPs must be carefully evaluated before they are applied in products because bismuth, when found at nanoscale levels, might present different toxicity and side effects than bismuth at a bulk scale, as we have seen in this present work.

In this study, we also demonstrated that the cell death pathway triggered by BiNPs was apoptosis, and this was a dose-dependent phenomenon. Similarly, Abudayyak et al. (2017) observed the same phenomenon with HepG2 and NRK-52E cells. They reported that glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) levels were significantly changed in those cells, indicating oxidative damage. It is known that apoptosis is triggered not only by BiNPs but also by other types of NPs, such as palladium (Alarifi et al.; 2017),

graphene oxide (Ding et al., 2014), titanium dioxide (Wang et al., 2014), carbon (Yan et al., 2017), silica (Wang et al., 2009) and silver (Chen et al., 2016) NPs.

As shown in this study, BiNPs seem to be endocytosed by cells. Additionally, once BiNPs were internalized, cell damage and stress occurred. This becomes clear due to the presence of cytoplasmic vesicles and myelin figures (Vejux et al., 2007; Watanabe et al., 2009). Myelin figures consist of lipid-rich multilamellar cytoplasmic structures that are formed through a caspase-independent event closely linked with the cytotoxicity of some compounds (Vejux et al., 2007). Additionally, the evidence of membrane degradation and processing might be linked to autophagy (Watanabe et al., 2009), a highly conserved homeostatic process where proteins or organelles are sequestered in a double-membrane-bound vesicle and later degraded. This self-digestion is crucial for the maintenance of tissue and organ homeostasis (Yao et al., 2013).

As already mentioned, some studies regarding chemically synthesized BiNPs have been performed. Staedler et al. (2015) demonstrated that A549, NCI-H520 and THP-1 cells endocytosed BiNPs, and, after 72 hours, they formed aggregates in intracellular organelles, such as lysosomes or endosomes. Similarly, Abudayyak et al. (2017) showed that cell uptake of BiNPs occurs in HepG2, NRK-52E, Caco-2 and A549 cells. Abudayyak et al. (2017) also demonstrated that in cell lines that were mostly killed by apoptosis, the cellular uptake was higher. Liu et al. (2017) showed that HEK293 cells endocytose BiNPs upon ATP consumption via a non-clathrin mediated pathway and that bismuth toxicity is likely associated with autophagy. More recently, they also demonstrated BiNPs lead to a temporary kidney injury in mice, a process in which is linked to autophagy (Liu et al., 2018).

Together, these studies may indicate that the mechanisms involved in cell damage and death caused by BiNPs are similar when it comes to either chemically or physically synthesized BiNPs, as we also suggest by our findings.

In conclusion, this work shows that BiNPs synthesized by LASiS are internalized by 3T3 cells, and they have cytotoxic effects in a dose dependent manner. When cells were exposed to a concentration equivalent to IC₅₀, they were internalized by the cells. Our results suggest that this interaction could cause ultrastructural damage possibly leading to cell death.

As a first approach for the evaluation of BiNPs cytotoxicity, we used BALB/c 3T3 cells since they are a reference cell line for cytotoxicity evaluations (ICCVAM, 2006c). However, for future studies, stem cells and other differentiated cells, such as immune and liver cells, should be addressed to evaluate the specific effect of BiNP in human cells. Kidney cells of human origin will be of particular interest once it has been found that BiNPs exposure is related to nephrotoxicity (Liu et al., 2018). Thus, further studies must be performed to completely understand the mechanism of cytotoxicity once BiNPs are internalized by the cells.

6.1.7 Acknowledgements

We would like to thank all the staff of Carlos Chagas Institute (Fiocruz- PR) for laboratory and administrative support, especially Dr. Cíntia Delai da Silva Horinouchi and Dr. María Julia Barisón for review and very useful suggestions. We would also like to thank Erica Shiroma and Anton Paar for providing the use of Litesizer 500. This study was supported by Fundação Araucária and PPSUS (Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS) Fundação Araucária-PR / SESA-PR/ CNPq/ MS-Decit. B.D. received fellowship from CNPq, T.L.R. from CAPES and A.C.P.C. from Fundação Araucária. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for the use of flow cytometry and microscopy facilities at Carlos Chagas Institute – Fiocruz/PR.

The authors report no potential conflicts of interest or financial interests.

6.1.8 REFERENCES

Abud, A. P., Zych, J., Reus, T. L., Kuligovski, C., de Moraes, E., Dallagiovanna, B. and de Aguiar, A. M. (2015) 'The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test', *Regul Toxicol Pharmacol*, 73(3), pp. 992-8.

Abudayyak, M., Öztaş, E., Arici, M. and Özhan, G. (2017) 'Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines', *Chemosphere*, 169, pp. 117-123.

Adjei, I. M., Sharma, B. and Labhasetwar, V. (2014) 'Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity', *Adv Exp Med Biol*, 811, pp. 73-91.

Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S. and Almeer, R. S. (2017) 'ROS-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Palladium Nanoparticles in Human Skin Malignant Melanoma Cells', *Oxid Med Cell Longev*, 2017, pp. 8439098.

Azhdarzadeh, M., Saei, A. A., Sharifi, S., Hajipour, M. J., Alkilany, A. M., Sharifzadeh, M., Ramazani, F., Laurent, S., Mashaghi, A. and Mahmoudi, M. (2015) 'Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology', *Nanomedicine (Lond)*, 10(18), pp. 2931-52.

Barcikowski, S. and Compagnini, G. (2013) 'Advanced nanoparticle generation and excitation by lasers in liquids', *Phys Chem Chem Phys*, 15(9), pp. 3022-6.

Böhme, U., Scheler, U. (2007) 'Effective charge of bovine serum albumin determined by electrophoresis NMR', *Chem Phys Lett*, 435, pp. 342-345.

Broeders, J. J., Blaauboer, B. J. and Hermens, J. L. (2013) 'In vitro biokinetics of chlorpromazine and the influence of different dose metrics on effect concentrations for cytotoxicity in Balb/c 3T3, Caco-2 and HepaRG cell cultures', *Toxicol In Vitro*, 27(3), pp. 1057-64.

Chen, N., Song, Z. M., Tang, H., Xi, W. S., Cao, A., Liu, Y. and Wang, H. (2016) 'Toxicological Effects of Caco-2 Cells Following Short-Term and Long-Term Exposure to Ag Nanoparticles', *Int J Mol Sci*, 17(6).

Claudio C-R, Chellam S. (2014) 'Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety' *Nanomed*, 17, pp. 430-438.

Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O. W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., Stokes, W. and Practice, S. E. T. F. o. G. C. C. (2005) 'Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice', *Altern Lab Anim*, 33(3), pp. 261-87.

Colvin, V. L. (2003) 'The potential environmental impact of engineered nanomaterials', *Nat Biotechnol*, 21(10), pp. 1166-70.

Corrêa, N.C.R., Kuligovski, C., Paschoal, A.C.C., Abud, A.P.R., Rebelatto, C.L.K., Leite, L.M.B., Senegaglia, A.C., Dallagiovanna, B., Aguiar, A.M. (2018) Human adipose-derived stem cells (ADSC) and human periodontal ligament stem cells (PDLSC) as cellular substrates of a toxicity prediction assay. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 92:75-82.

Ding, Z., Zhang, Z., Ma, H. and Chen, Y. (2014) 'In vitro hemocompatibility and toxic mechanism of graphene oxide on human peripheral blood T lymphocytes and serum albumin', *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(22), pp. 19797-807.

ECCVAM. (2018) 'Acute toxicity'. Available at: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/acute-toxicity>

El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., El-Ghamry, A., Agaypi, K. M., Elsayed, M. A. and Gobara, M. (2017) 'Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity', *J Photochem Photobiol B*, 173, pp. 120-139.

Elsaesser, A. and Howard, C. V. (2012) 'Toxicology of nanoparticles', *Adv Drug Deliv Rev*, 64(2), pp. 129-37.

Fard, J.K., Jafari, S., Eghbal, M.A. (2015) 'A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles', *Adv Pharm Bull*, 5(4), pp. 447-454.

Hernandez-Delgadillo, R., Del Angel-Mosqueda, C., Solís-Soto, J. M., Munguia-Moreno, S., Pineda-Aguilar, N., Sánchez-Nájera, R. I., Chellam, S. and Cabral-Romero, C. (2017) 'Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles', *Dent Mater J*.

Hernandez-Delgadillo, R., Velasco-Arias, D., Martinez-Sanmiguel, J. J., Diaz, D., Zumeta-Dube, I., Arevalo-Niño, K. and Cabral-Romero, C. (2013) 'Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation', *Int J Nanomedicine*, 8, pp. 1645-52.

Hrouzek, P., Kapuścik, A., Vacek, J., Voráčová, K., Paichlová, J., Kosina, P., Voloshko, L., Ventura, S. and Kopecký, J. (2016) 'Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine in vitro cell models', *Ecotoxicol Environ Saf*, 124, pp. 177-185.

ICCVAM. (2001) 'Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity'. Available at: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf

ICCVAM. (2006a) 'Background Review Document: in Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity', 1. Available at: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/brdvol1_nov2006.pdf.

ICCVAM. (2006b) 'Background Review Document: in Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity', 2. Available at:

http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmter/brdvol2_nov2006.pdf.

ICCVAM. (2006c) 'Recommended Test Method Protocol: BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method'. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm.

ICCVAM. (2006d) 'Recommended Test Method Protocol: Normal Human Keratinocyte NRU Cytotoxicity Test Method'. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm.

ICCVAM. (2006e). 'Test Method Evaluation Report (TMER): in Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing'. Available at: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmter/at-tmter-complete.pdf.

Izak-Nau, E., Voetz, M., Eiden, S., Duschl, A., Puentes, V.F. (2013) 'Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation', Part Fibre Toxicol, 10(56), pp. 1-12.

Ju-Nam, Y. and Lead, J. R. (2008) 'Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications', Sci Total Environ, 400(1-3), pp. 396-414.

Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C. (2012) 'Detection of apoptosis by TUNEL assay', Methods Mol Biol, 887, pp. 41-7.

Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) 'Cytotoxicity of nanoparticles', Small, 4(1), pp. 26-49.

Li, Z., Hu, Y., Howard, K. A., Jiang, T., Fan, X., Miao, Z., Sun, Y., Besenbacher, F. and Yu, M. (2016) 'Multifunctional Bismuth Selenide Nanocomposites for Antitumor Thermo-Chemotherapy and Imaging', ACS Nano, 10(1), pp. 984-97.

Liman, R., Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet Assay, *Chemosphere* **93**, 2013, 269-273.

Liu, J., Zheng, X., Yan, L., Zhou, L., Tian, G., Yin, W., Wang, L., Liu, Y., Hu, Z., Gu, Z., Chen, C. and Zhao, Y. (2015) 'Bismuth sulfide nanorods as a precision nanomedicine for in vivo multimodal imaging-guided photothermal therapy of tumor', ACS Nano, 9(1), pp. 696-707.

Liu, Y., Zhuang, J., Zhang, X., Yue, C., Zhu, N., Yang, L., Wang, Y., Chen, T. and Zhang, L. W. (2017) 'Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells', Toxicol Lett, 275, pp. 39-48.

Liu, Y., Yu, H., Zhang, X., Wang, Y., Song, Z., Zhao, J., Shi, H., Ruibin, L., Wang, Y. and Zhang, L.W. (2018) 'The protective role of autophagy in nephrotoxicity

induced by bismuth nanoparticles through AMPK/mTOR pathway', *Nanotoxicol*, pp. 1-16.

Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T. and Dawson, K. A. (2008) 'Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(38), pp. 14265-70.

Mannerström, M., Zou, J., Toimela, T., Pyykkö, I. and Heinonen, T. (2016) 'The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes', *Toxicol In Vitro*, 37, pp. 113-120.

Monopoli, M. P., Pitek, A. S., Lynch, I. and Dawson, K. A. (2013) 'Formation and characterization of the nanoparticle-protein corona', *Methods Mol Biol*, 1025, pp. 137-55.

Nath Roy, D., Goswami, R. and Pal, A. (2017) 'Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology?', *Xenobiotica*, 47(7), pp. 632-643.

OECD. (2010) 'Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129.' Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd129.pdf>

Rahman, M., Laurent, S., Tawil, N., Yahia, L. and Mahmoudi M. (2013) 'Nanoparticle and Protein Corona'. In: *Protein-Nanoparticle Interactions*. Springer Series in Biophys, 15, pp.21-44.

Rosa, R.G.T., Duarte, C.A., Schreiner, W.H., Mattoso-Filho, N.P., Bezzerá Jr, A.G., Barisson, A., Ocampos, F.M.M. (2014) 'Structural, morphological and optical properties of Bi NPs obtained by laser ablation and their selective detection of L-cysteine', *Colloids Surf Phys Chem Eng Aspects A*, 457, pp. 368-373.

Sano, Y., Satoh, H., Chiba, M., Okamoto, M., Serizawa, K., Nakashima, H. and Omae, K. (2005) 'Oral toxicity of bismuth in rat: single and 28-day repeated administration studies', *J Occup Health*, 47(4), pp. 293-8.

Scanu, M., Mancuso, L. and Cao, G. (2011) 'Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests', *Toxicol In Vitro*, 25(8), pp. 1989-95.

Sigma-Aldrich (2017). 'Safety Data Sheet: Bismuth' Available at: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=556130&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F556130%3Flang%3Dpt>.

Staedler, D., Passemard, S., Magouroux, T., Rogov, A., Maguire, C. M., Mohamed, B. M., Schwung, S., Rytz, D., Jüstel, T., Hwu, S., Mugnier, Y., Le Dantec, R., Volkov, Y., Gerber-Lemaire, S., Prina-Mello, A., Bonacina, L. and Wolf, J. P. (2015) 'Cellular uptake and biocompatibility of bismuth ferrite harmonic advanced nanoparticles', *Nanomedicine*, 11(4), pp. 815-24.

Stewart, C., Konstantinov, K., McKinnon, S., Guatelli, S., Lerch, M., Rosenfeld, A., Tehei, M. and Corde, S. (2016) 'First proof of bismuth oxide nanoparticles as efficient radiosensitisers on highly radioresistant cancer cells', *Phys Med*, 32(11), pp. 1444-1452.

Stoccoro, A., Di Bucchianico, S., Uboldi, C., Coppedè, F., Ponti, J., Placidi, C., Blosi, M., Ortelli, S., Costa, A. L. and Migliore, L. (2016) 'A panel of in vitro tests to evaluate genotoxic and morphological neoplastic transformation potential on Balb/3T3 cells by pristine and remediated titania and zirconia nanoparticles', *Mutagenesis*, 31(5), pp. 511-29.

Stokes, W. S. (2002) 'Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing', *ILAR J*, 43 Suppl, pp. S31-8.

Swy, E. R., Schwartz-Duval, A. S., Shuboni, D. D., Latourette, M. T., Mallet, C. L., Parys, M., Cormode, D. P. and Shapiro, E. M. (2014) 'Dual-modality, fluorescent, PLGA encapsulated bismuth nanoparticles for molecular and cellular fluorescence imaging and computed tomography', *Nanoscale*, 6(21), pp. 13104-12.

The Project on Emerging Nanotechnologies (2018). Available at: <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=bismuth>.

Thorne, D., Kilford, J., Payne, R., Haswell, L., Dalrymple, A., Meredith, C. and Dillon, D. (2014) 'Development of a BALB/c 3T3 neutral red uptake cytotoxicity test using a mainstream cigarette smoke exposure system', *BMC Res Notes*, 7, pp. 367.

Treuel, L., Docter, D., Maskos, M. and Stauber, R. H. (2015) 'Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity', *Beilstein J Nanotechnol*, 6, pp. 857-73.

Uboldi, C., Urbán, P., Gilliland, D., Bajak, E., Valsami-Jones, E., Ponti, J. and Rossi, F. (2016) 'Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts', *Toxicol In Vitro*, 31, pp. 137-45.

UN (United Nations). 'Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) Forth Revised Edition'. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf.

US EPA (United States Environmental Protection Agency). 'CHEMICAL HAZARD CLASSIFICATION AND LABELING : COMPARISON OF OPP REQUIREMENTS

AND THE GHS' (2004). Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ghscriteria-summary.pdf>.

Veintemillas-Verdaguer, S., Luengo, Y., Serna, C. J., Andrés-Vergés, M., Varela, M., Calero, M., Lazaro-Carrillo, A., Villanueva, A., Sisniega, A., Montesinos, P. and Morales, M. P. (2015) 'Bismuth labeling for the CT assessment of local administration of magnetic nanoparticles', *Nanotechnology*, 26(13), pp. 135101.

Vejux, A., Kahn, E., Ménétrier, F., Montange, T., Lherminier, J., Riedinger, J. M. and Lizard, G. (2007) 'Cytotoxic oxysterols induce caspase-independent myelin figure formation and caspase-dependent polar lipid accumulation', *Histochem Cell Biol*, 127(6), pp. 609-24.

Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y. and Liu, J. (2009) 'Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells', *Toxicol In Vitro*, 23(5), pp. 808-15.

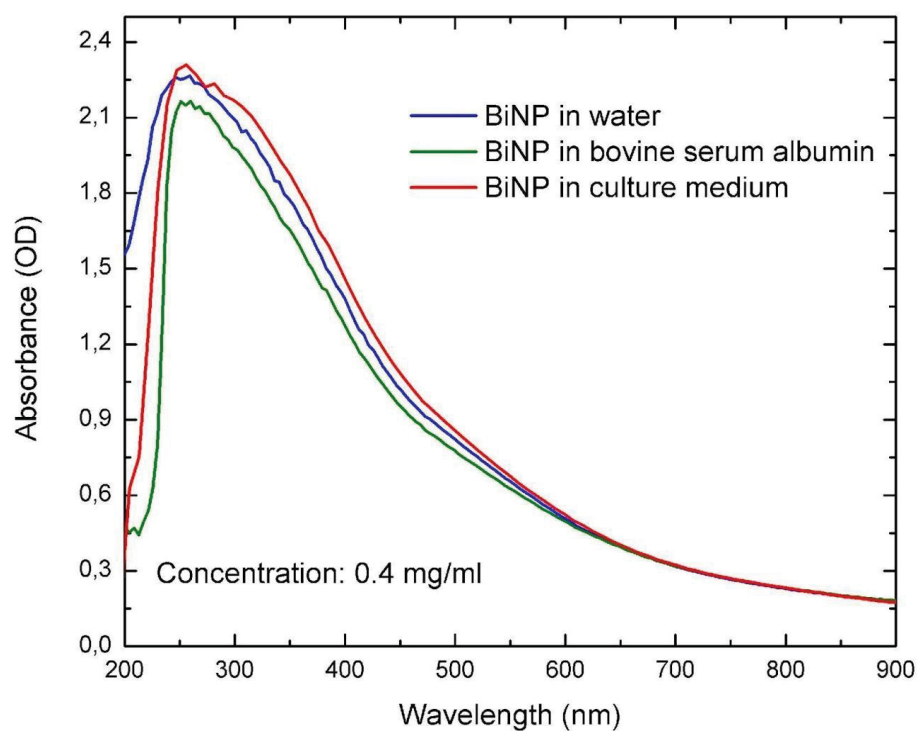
Wang, Y., Wu, S., Zhao, X., Su, Z., Du, L. and Sui, A. (2014) 'In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells', *Biomed Mater Eng*, 24(6), pp. 2007-13.

Watanabe, E., Muenzer, J. T., Hawkins, W. G., Davis, C. G., Dixon, D. J., McDunn, J. E., Brackett, D. J., Lerner, M. R., Swanson, P. E. and Hotchkiss, R. S. (2009) 'Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study', *Lab Invest*, 89(5), pp. 549-61.

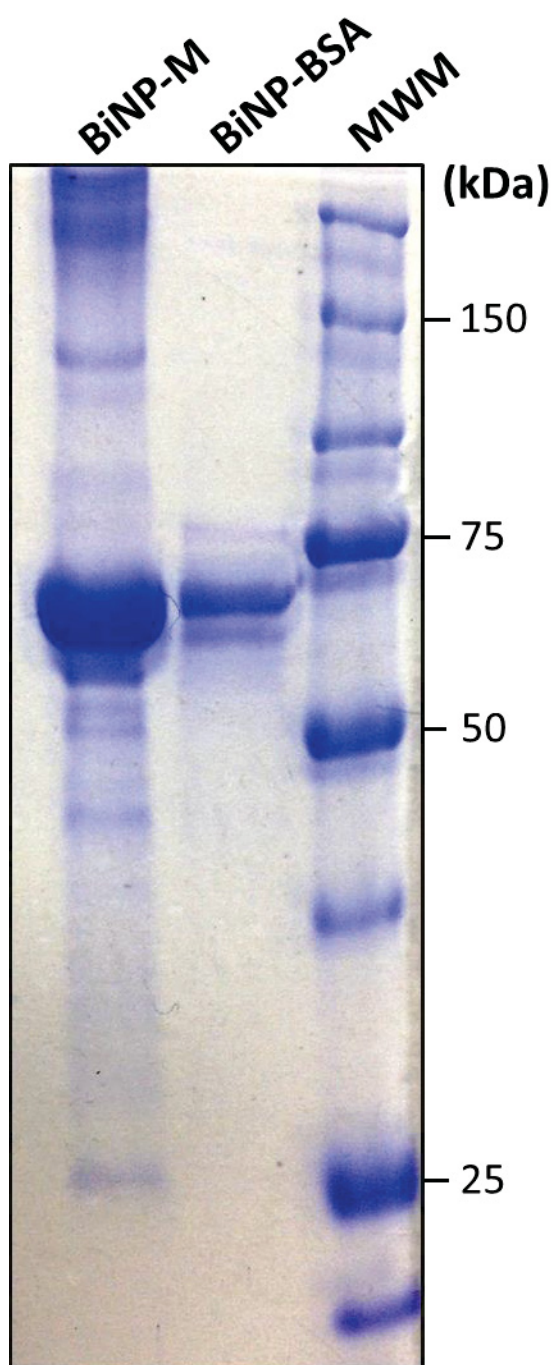
Yan, X., Yang, W., Shao, Z., Yang, S. and Liu, X. (2017) 'Triggering of apoptosis in osteosarcoma cells by graphene/single-walled carbon nanotube hybrids via the ROS-mediated mitochondrial pathway', *J Biomed Mater Res A*, 105(2), pp. 443-453.

Yao, H., Zhao, D., Khan, S. H. and Yang, L. (2013) 'Role of autophagy in prion protein-induced neurodegenerative diseases', *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(6), pp. 494-502.

6.1.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL



BiNPs paper - Figure S 1: BiNP (in water, culture medium and BSA) concentration assessed by UV-Vis spectroscopy.



BiNPs paper - Figure S 2: BiNP corona observed by acrylamide gel 10%. BiNPs resuspended in medium (BiNP-M; first lane) and BSA (BiNP-BSA; second lane) were evaluated by SDS-PAGE. MWM: Molecular Weight Marker (Odyssey One-Color Protein, Li-Cor).

Replicate	IC ₈₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₂₀ (µg/ml)	R ²	LD ₅₀ predicted (mg/ml)	GHS Class
1	60.80	21.09	7.07	0.9613	328.50	4
2	58.19	20.71	6.49	0.9734	326.31	4
3	93.17	45.93	23.19	0.9922	438.85	4
4	88.90	32.91	7.55	0.9235	387.66	4
5	88.56	24.50	2.89	0.9733	347.36	4
6	101.15	25.49	9.78	0.9481	398.70	4
7	56.95	18.95	7.32	0.9676	315.71	4
Mean±SD	78.32± 18.9	28.51±9.96	9.18± 6.51	0.9628± 0.0202	363.3± 45.92	

BiNPs paper - Table S 1: IC values, LD₅₀ and the predicted GHS class for each experiment for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in medium (n=7) and R² for each Hill function curve. Values are expressed as the means±standard deviation.

Replicate	IC ₈₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₂₀ (µg/ml)	R ²	LD _{50 predicted} (mg/ml)	GHS Class
1	55.47	18.55	6.45	0.9653	311.09	4
2	88.79	34.66	12.46	0.9345	395.22	4
3	71.19	23.75	6.9	0.9435	342.34	4
Mean±SD	71.82± 16.67	25.54± 8.37	8.6± 3.35	0.9478± 0.0129	349.55± 42.53	

BiNPs paper - Table S 2: IC values, LD₅₀ and the predicted GHS class for each experiment for the cytotoxicity evaluation of BiNPs in BSA (n=3) and R² for each Hill function curve. Values are expressed as the means±standard deviation.

7 CAPÍTULO III

Artigo

Dose-dependent cell necrosis Induced by Silica Nanoparticles
Situação – Submetido para a revista *Toxicology in vitro*

Prefácio

Este capítulo apresenta o artigo submetido para a revista *Toxicology in vitro*, o qual descreve a produção e caracterização de dois tipos de SiO₂NPs produzidas quimicamente, assim como a avaliação da citotoxicidade de ambos tipos de NPs, bem como a interação e morte celular de um dos tipos de NPs com células BALB/c 3T3. Tais abordagens compunham os objetivos específicos desta Tese.

Dose-dependent cell necrosis Induced by Silica Nanoparticles

Thamile Luciane Reus¹, Bruna Hilzendeger Marcon¹, Ariane Caroline Campos Paschoal¹, Iris Renata Ribeiro^{2,3}, Mateus Borba Cardoso^{2,3}, Bruno Dallagiovanna^{1,*}, Alessandra Melo de Aguiar^{1,*}

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ Paraná, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.

² Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) and Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), CNPEM, Campinas, São Paulo, Brazil.

³ Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil.

*Corresponding authors at: Instituto Carlos Chagas, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, FIOCRUZ Paraná, 3775, 81350-010, Curitiba, PR, Brazil.
Telephone number: +55 4121043231

E-mail addresses: thamilelreus@gmail.com (Thamile Luciane Reus), bruna.marcon@fiocruz.br (Bruna H. Marcon), arianepaschoal@hotmail.com (Ariane Caroline Campos Paschoal), alessandra.aguiar@fiocruz.br (Alessandra Melo de Aguiar), bruno.dallagiovanna@fiocruz.br (Bruno Dallagiovanna).

7.1.1 HIGHLIGHTS:

- Silica nanoparticles are taken up by 3T3 cells and are found around and within cells;
- Silica nanoparticles are found in vacuole-like structures within cells;
- Silica nanoparticles at high concentration lead to cell necrosis;

7.1.2 ABSTRACT

In recent years, much attention has been given to nanoparticles (NPs) due to their many possible applications, and as research has progressed, these NPs have become valuable tools for medical purposes. Among many different types of NPs, silica nanoparticles (SiO₂NPs) have been specifically evaluated for medical purposes and have also been used in many different types of products. Although SiO₂NPs have already been applied and are believed to be nontoxic, there is still a concern regarding possible adverse effects that may be triggered after SiO₂NP exposure. Therefore, in the present study, we employed a recommended cell line (BALB/c 3T3) for the toxicity evaluation to investigate the cytotoxic effects of SiO₂NPs. First, we evaluated the cytotoxic effects of two types of SiO₂NPs (nonfluorescent and fluorescent) and found that they were not significantly different ($IC_{50} = 1986.39 \pm 237 \mu\text{g/ml}$ and $IC_{50} = 1861.13 \pm 186.72 \mu\text{g/ml}$, respectively). Then, we used the predicted LD₅₀ of both types of SiO₂NPs to suggest that they could be categorized as GHS category 4 substances in order to estimate the starting doses for acute oral systemic toxicity tests. By ultrastructural evaluation, we found that SiO₂NPs are internalized by 3T3 cells and are located in vacuole-like structures. We also found that SiO₂NPs cause hormetic effects in BALB/c 3T3 cells and lead to cell necrosis in a dose-dependent manner.

Key words: SiO₂NPs, cytotoxicity, 3T3, nanotoxicology

7.1.3 INTRODUCTION

Nanotechnology is a general term that refers to engineering and manufacturing on the nanoscale that includes nanoparticles (NPs) (Saha, 2009). In recent years, the production of NPs has grown exponentially (Elssaesser & Howard, 2012), and as research progresses, NPs have become promising tools for biomedical diagnostics and therapeutics (Azhdarzadeh et al., 2015). However, the real toxicological impact and possible hazards of NPs to human health and the environment are still under investigation (Elssaesser & Howard, 2012). Although the applications of NPs have been widespread, there are many reports concerning the side effects of NPs on biological systems and cellular organelles (Fard et al., 2015). In fact, the literature remains unclear and includes many conflicting reports of cytotoxicity and biological fate, even for identical NPs (Azhdarzadeh et al., 2015). Comprehending nanoparticle pathways and mechanisms in biological systems may help regulatory bodies elaborate policies related to the toxicological potential of nanomaterials (Elssaesser & Howard, 2012).

Among all types of NPs, silica nanoparticles (SiO₂NPs) have been used in an increasing number of applications, including those related to disease diagnostics, imaging, drug delivery, food, cosmetics and biosensors (Mohamed et al., 2011). These SiO₂NPs are particularly interesting because they are easily produced at low cost. Therefore, their use is continually increasing in commercial products (Izak-Nau et al., 2013). To date, SiO₂NPs have been used in 44 products, such as construction and cleaning materials, coatings, automotive accessories, electronics, and even cosmetics and food supplements (The Project on Emerging Nanotechnologies, 2019). SiO₂NPs are also very interesting

because they can be functionalized with different fluorescent molecules, resulting in fluorescent NPs. Since they can be more easily detected, these NPs may be imaged within the cells and on cell surfaces (Izak-Nau et al., 2013). Therefore, fluorescent SiO₂NPs can be used as lysosome-targeting nanosensors (Zhang et al., 2018), bioimaging agents and protective nanocarriers (Gomes et al., 2016) and chemical sensors, such as a pH indicator (Burns et al., 2006), as well as for single bacterial cell quantification (Zhao et al., 2004).

Even though SiO₂NPs have been applied and are believed to be nontoxic, there is still a concern about adverse health effects that may be triggered by SiO₂NP exposure (Ubaldi et al., 2012; Izak-Nau et al., 2013).

To assess the toxic effects of NPs, cytotoxicity assays can be performed. One of the best strategies for completing an assay is to employ already existing and validated methods for assessing the cytotoxic effects of chemicals (Mannerström et al., 2016). Currently, NP interactions with biological systems are mainly based on in vitro methods already established for chemicals (Kroll et al., 2009). In vitro assays have attracted much attention because they are fast, convenient and less expensive than animal models (Fard et al., 2015). Additionally, reducing the use of animals has social, economical and ethical implications (Abud et al., 2015) and it is a main concern worldwide, including many projects and initiatives to establish the in vitro and in vivo relationships to reduce the animal use according to OECD Guideline 129 (OECD, 2010).

Among all types of cells used for toxicity evaluation, BALB/c 3T3 cells have many advantages because they correlate well with primary cells (Hrouzek et al., 2016), and they are generally more than 1000 times more sensitive than the in vivo studies (Zou et al., 2014). Additionally, these cells have been extensively used

for the evaluation of cytotoxic effects of chemicals (Thorne et al., 2014; Abud et al., 2015; Hrouzek et al., 2016), including NPs (Mannerström et al., 2016; Stoccoro et al., 2016; Uboldi et al., 2016). BALB/c 3T3 cells are recommended for estimating starting doses for acute toxicity (ICCVAM, 2001). Assessment of acute toxicity is generally the first step for identifying the relative health hazard of chemicals, once every substance has to be labeled to identify its hazard potential (ICCVAM, 2001). In addition, it is extremely important to evaluate the acute oral toxicity of substances, especially when the digestive tract is one of the exposure routes of a chemical. The GHS categorizes chemicals into 5 categories of acute oral toxicity, based on their lethal dose 50 (LD50) for hazard communication purposes (US EPA, 2004).

Therefore, once SiO₂NPs have been evaluated for health purposes and oral intake has been identified as one of the exposure routes, it is necessary to assess their acute toxic effects. It is important to point out that reliable and robust results regarding the toxic effects of SiO₂NPs in vitro may only be better achieved by using homogeneous and characterized NPs in standard models for assessing toxicity (Izak-Nau et al., 2013).

In the present study, we evaluated the interaction between SiO₂NPs and BALB/c 3T3 cells. Both types of SiO₂NPs (fluorescent and nonfluorescent) were chemically produced and characterized. They both presented similar cytotoxic effects and were predicted as GHS category 4 substances, and the starting doses for animal testing were estimated to be 300 mg/kg based on OECD 423. SiO₂NPs were found around and within cells in vacuole-like structures, presented hormetic effects and induced necrosis in BALB/c 3T3 cells at the ultrastructural level.

7.1.4 METHODS

7.1.4.1 *Synthesis and characterization of SiO₂NPs*

7.1.4.1.1 *Bare SiO₂NP synthesis*

The bare SiO₂NPs were prepared using a modified Stöber method which has been extensively described in the literature (Leirose et al., 2011; Capeletti et al., 2014). In summary, 0.63 mL of tetraethyl orthosilicate (TEOS) was added to 30 mL of ethanol under continuous stirring for 30 min. Then, 1.50 mL of ammonia solution 28 wt% was added as a catalyst to the mixture, and this mixture was stirred for 3 hours. Subsequently, 0.63 mL of TEOS was added again and the reaction was stirred overnight at room temperature. The particles were separated by centrifugation (10000 rpm for 15 min; Hitachi Centrifuge Model CR22N, Chiyoda, Tokyo, Japan) and washed once with ethanol and four times with deionized water. SiO₂NPs were dispersed in aqueous solution and the final concentration was set to 10.0 g L⁻¹.

7.1.4.1.2 *Fluorescent SiO₂NP synthesis*

The dye precursor was synthesized by conjugation of the isothiocyanate group of rhodamine B isothiocyanate (RBITC) to (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) at a molar ratio of 50:1 (dye:APTES) in absolute ethanol under nitrogen flow. The resulting solution was continuously stirred for 24 hours. The conjugate was then hydrolyzed in a basic ethanolic solution with TEOS and catalyzed by ammonia (Larson et al., 2008). In summary, 0.02 mL of dye precursor and 0.51 mL of TEOS were added to 30 mL of ethanol under continuous stirring for 30 min. Then, 1.50 mL of ammonia solution 28 wt% was added and the resulting mixture

was stirred for 3 hours. Subsequently, 0.02 mL of conjugate and 0.51 mL of TEOS were added again and the reaction was stirred overnight. A silica shell was synthesized around the preformed fluorescent core by the addition of ten 65 μL aliquots of TEOS every 15 min. The resulting suspension was continually stirred for 24 hours, and the RBITC-SiO₂NPs were then centrifuged (10000 rpm, 15 min) and subsequently washed once with ethanol and four times with deionized water. RBITC-SiO₂NPs were dispersed in aqueous solution, and the final concentration was set to 5.70 g L⁻¹.

7.1.4.1.3 SiO₂NPs characterization

The particle size (Z-average), polydispersity index (PDI) and zeta measurement of the dispersions were determined using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK). The size and PDI measurements were taken at 25°C at an angle of 173°, and the data were calculated as the mean of three successive analyses (100 s) for at least three independent samples. The dispersions were diluted with water to adjust the signal level. Zeta potential measurements were used to evaluate the residual charge of the bare and fluorescent silica nanoparticles. The measurements were taken using a He-Ne (633 nm) laser. For the analysis, a dispersion of nanoparticles (1 mg.mL⁻¹) was prepared in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4). Three measurements (each consisting of at least 10 scans) were taken for each sample.

Electron microscopy was performed using a scanning transmission electron microscope (SEM-FEM HR, FEI Inspect) operating at an accelerating voltage of 10 kV at the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano).

Images were acquired in scanning mode. The samples were deposited onto 400 mesh holey carbon-coated copper grids.

Fluorescence measurements were performed using a TECAN spectrophotometer (Infinite 2000). The analyses were performed in a 96-well plate. The excitation parameter was fixed at 524 nm, and emission spectra were generated at 560-700 nm. The gain value was kept constant at 120, and three measurements were taken for each sample.

7.1.4.2 Cell culture

For this study, a cell line recommended by International Regulatory Agencies was used. Skin fibroblasts, 3T3 NIH Clone A31 cells (3T3 cells), from embryonic BALB/c mice (Rio de Janeiro Cell Bank – BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) were cultured and plated as standardized and reported in previous work by our group (Reus et al., 2018).

7.1.4.3 Neutral red uptake assay

To evaluate cytotoxicity, neutral red uptake (NRU) was performed based on the OECD protocol (OECD, 2010). NRU is a quantitative cell viability assay recommended by the OECD (OECD, 2010) for use in estimating the initial doses for the acute oral toxicity test. For this assay, cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 2.5×10^4 cells/ml (100 μ l/well) and cultured for 24 hours.

SiO₂NPs were diluted and prepared according to ICCVAM recommendations (ICCVAM, 2006b). SiO₂NPs were prepared in serial dilutions by using a log factor of 1.47. Since SiO₂NPs were produced in a water solution, they were directly added to the culture medium. For each plate, eight serial dilutions of SiO₂NPs ranging from 192.1-7750 μ g/ml (log factor: 1.47) were prepared in DMEM

supplemented with 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 200 IU/ml penicillin and 0.2 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and they were added to culture plates where they remained for 48 hours of incubation.

To guarantee the quality of the assay, a positive control of SDS was included, and the assay was considered valid only when conducted in accordance with ICCVAM guidelines (ICCVAM, 2006c).

After incubation, the cells were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS). Then, the cells were stained with 25 µg/mL neutral red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in DMEM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 4 mM L-glutamine (Gibco Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 3 hours at 37°C. Then, the cells were rinsed with DPBS, and excess neutral red was extracted with a solution composed of 50% ethanol and 1% acetic acid (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA). Next, the plates were shaken for 20-45 min. The optical density of the samples was measured at 540 nm using a Synergy H1 Multi-Mode reader (Biotek, Winooski, Vermont, USA).

For all tests, the acceptance criteria according to the BALB/c 3T3 NRU cytotoxicity test method recommended by ICCVAM (Test Acceptance Criteria for Positive Control and Test Acceptance Criteria for Test Substances) were used (ICCVAM, 2006c).

Data were analyzed following ICCVAM recommendations, and the values of IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ and the predicted LD₅₀ were assessed (OECD, 2010; ICCVAM, 2006c; ICCVAM, 2006e; Scanu et al., 2011; Abud et al., 2015). First, data were

analyzed in Microsoft Office Excel to determine cell viability. Then, the data were converted into a percentage of the control. To determine the IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ values, the data were transferred to GraphPad Prism® 6.0, and a sigmoidal dose response (variable slope) with four parameters was obtained. Then, the parameters were used with the rearranged Hill function. Outliers were identified using the Grubbs test (available online at <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). In addition, IC₅₀ was used to predict LD₅₀ ($\log \text{LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024$ ($R^2 = 0.325$)) and determine GHS category (based on the LD₅₀ value).

7.1.4.4 Transmission Electron Microscopy - TEM

To analyze the interaction between SiO₂NPs and 3T3 cells, we used transmission electron microscopy (TEM). First, 2.5x10⁴ cells/mL (2 mL/well) were plated in a 6-well plate, and after 24 hours, the SiO₂NPs were added at 3 different concentrations and retained for 24 hours: an IC₅₀ concentration (1986.36 µg/mL) and two nontoxic concentrations (465.1 µg/mL and 1129.1 µg/mL). The nontoxic concentrations corresponded to two different concentrations at which cells remained 100% viable. The protocol for TEM was performed as reported in a previous work by our group (Reus et al., 2018).

7.1.4.5 TUNEL Assay

The terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed to evaluate apoptosis. By TUNEL, it is possible to detect apoptotic cells that have undergone DNA degradation in the late stages of apoptosis (Kyrylkova et al., 2012).

Cells (2.5×10^4 cells/ml) were seeded in 96-well plates (100 μ L/well) and cultured for 24 hours. SiO₂NPs were prepared in culture medium at IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ concentrations; then, they were added to the cell culture plates. After 24 hours, the medium was discharged and the cells were washed once with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min.

Then, the TUNEL assay was performed following the manufacturer's instructions (Click-iT® TUNEL Alexa Fluor Imaging Assay – Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Additionally, the nuclei were stained with Hoechst (included in the kit). Four wells of each condition were then analyzed using Operetta CLS (Perkin Elmer). Twenty-five pictures of each well were captured through the 20x objective lens. A positive control (DNase) included in the kit was set as the model for positive staining. Three independent assays were performed.

7.1.4.6 Ethidium bromide and acridine orange differential staining assays

Necrotic cell death was quantified by the differential staining method, using ethidium bromide (EB) and acridine orange (AO) dyes, according to a protocol adapted from McGahon et al. (1995). Balb/c 3T3 cells (2.5×10^4 cells/mL) were seeded in 96-well plates and cultured for 24 hours. SiO₂NPs were prepared in culture medium at concentrations of IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀. As a positive control, treatment with hydrogen peroxide (Farmax, Belo Horizonte, BRA) at a concentration of 0.5 mM was used, and in the negative control, the cells were treated with culture medium. The different treatments were added, and the cells were incubated for another 24 hours. Then, 4 μ L of a 1:1 solution of AO (100 μ g / mL) / EB (100 μ g / mL) was added to the treated cell culture. Finally, the images were acquired with the Operetta CLS system (Perkin Elmer). Six wells were

analyzed, with 25 photos of each well taken with the 20x objective lens for each treatment at a maintained temperature of 37°C and 5% CO₂ during the analysis. Data were collected by Harmony 4.5 software (Perkin Elmer) and analyzed in GraphPad Prism® 6.0. The results were expressed as the number of cells positive for ethidium bromide stain (necrotic cells). Three independent assays were performed.

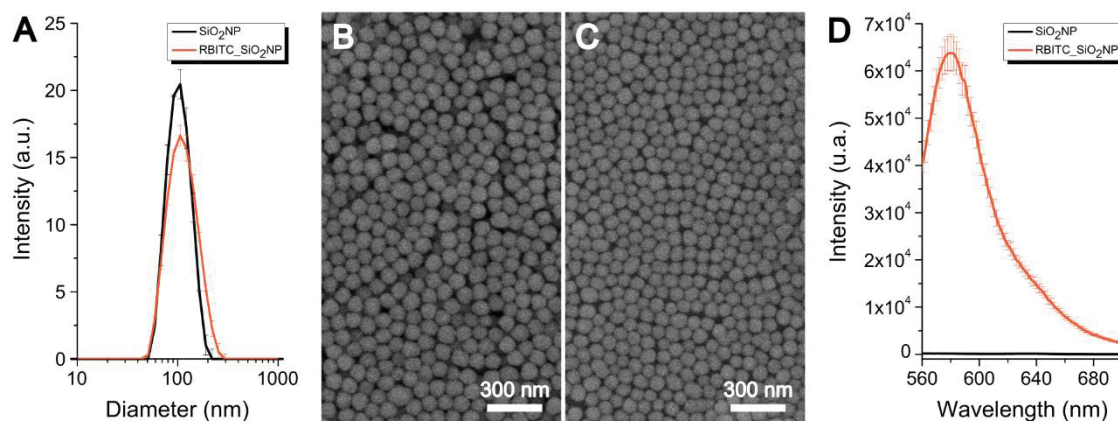
7.1.4.7 Statistical analysis

All data were reported as the means \pm standard deviations (SDs). One-way ANOVA and Tukey's posttest were used to compare IC values between both types of SiO₂NPs. For TUNEL, differences among all conditions were calculated by one-way ANOVA and Dunnett's posttest. For all evaluations, GraphPad Prism® 6.0 was used, and *p* values less than 0.05 were considered to indicate significant differences.

7.1.5 RESULTS

7.1.5.1 *SiO₂NPs characterization*

SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs were investigated by DLS, zeta potential, SEM and fluorescence spectroscopy. Based on the DLS results (Figure 1A), SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs presented average hydrodynamic diameters of 98.9 ± 0.7 and 107.3 ± 0.4 nm, respectively, with considerably low polydispersity. The negative zeta potentials observed for both NPs (-44,4 mV for SiO₂NPs and -38.7 mV for RBITC-SiO₂NPs) are related to negatively charged hydroxyl groups on their surface (Oliveira et al., 2018). Figures 1B and C, obtained by SEM, show the typical morphology of SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs as quasi-spherical structures. In addition, from the SEM image, it was also possible to obtain particle size distributions, which presented the average mean values of 80 nm for both SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs. The average mean values determined by DLS are considerably larger than those obtained by SEM. This discrepancy is because SEM relies on a number-based measurement in a dried state, while DLS is a scatter-based technique used for aqueous suspensions. Furthermore, the emission spectrum for the NPs is presented in Figure 1D. As expected, SiO₂NPs did not show fluorescence, while the RBITC-SiO₂NPs showed fluorescence in the red region with maximum emission at 580 nm.



SiO₂NPs paper - Figure 1: Characterization data of the SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs. A) DLS measurements for nanoparticle dispersion (1 g L⁻¹). SEM images of B) SiO₂NPs and C) RBITC-SiO₂NPs. D) Fluorescence measurements of the nanoparticle dispersion (1 g L⁻¹). Three independent DLS and fluorescence experiments were conducted. The triplicate mean is shown, with error bars representing the standard deviation values.

7.1.5.2 SiO₂NP cytotoxicity evaluation

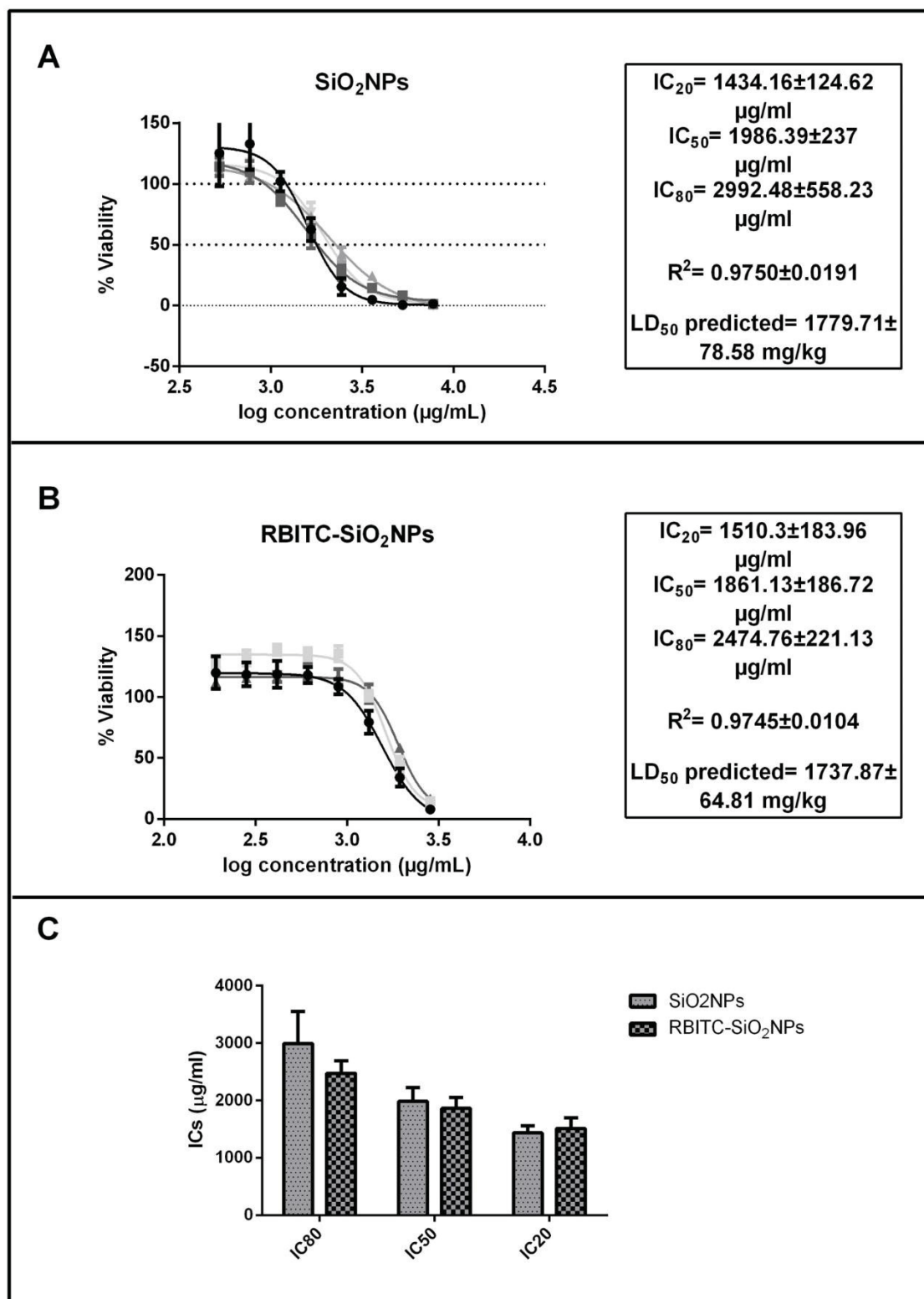
The cytotoxic effects of SiO₂NPs were evaluated by neutral red uptake assay (NRU). For the assessment, SiO₂NPs concentrations from 522.5-7750 µg/ml (dilution log factor: 1.47) were considered. The IC values were as follows: IC₈₀= 2992.48±558.23 µg/ml, IC₅₀=1986.39±237 µg/ml and IC₂₀= 1434.16±124.62 µg/ml (Figure 2A). The predicted LD₅₀ was 1779.71±78.58 mg/kg (Figure 2A), indicating that these NPs might belong to GHS category 4 for inducing acute toxicity.

Additionally, to compare the cytotoxic effects of SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs, the same assay for SiO₂NPs was performed for RBITC-SiO₂NPs. For the assessment, RBITC-SiO₂NPs concentrations from 192.1-2850 µg/ml (dilution log factor: 1.47) were used. For these NPs, the IC values were as follows: IC₈₀= 2474.76±221.13 µg/ml, IC₅₀= 1861.13±186.72 µg/ml and IC₂₀= 1510.3±186.96 µg/ml (Figure 2B). The predicted LD₅₀ was 1737.87±64.81 mg/kg (Figure 2B), suggesting that the RBITC-SiO₂NPs, similar to the SiO₂NPs, might belong to GHS category 4 for inducing acute toxicity.

Finally, all the IC values for SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs were compared, and no significant differences were detected between them (Figure 2C), indicating that the dye precursor located in the core of the particle does not interfere with the ultimate cytotoxic effects of the nanoparticle.

Additionally, the predicted LD₅₀ can be used for the estimation of the initial dose for acute oral toxicity assay, with a suggested starting dose of 300 mg/kg for animal testing in accordance with OECD 423 (Abud et al., 2015).

In this first approach, the main objective was to evaluate the cytotoxic effects of SiO₂NPs using the recommended protocol for cytotoxicity evaluation. Since the cytotoxic effects of SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs were similar, the following experiments were only performed with SiO₂NPs.

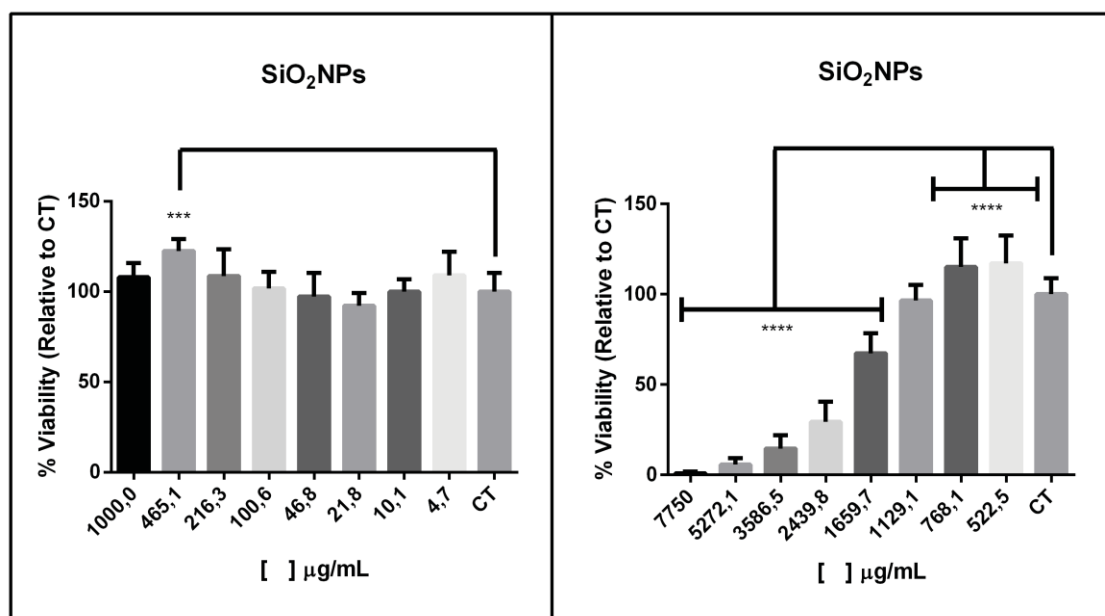


SiO₂NPs paper - Figure 2: The cytotoxic effects of SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs were not different. The cytotoxic effects of NPs were assessed by NRU. Murine BALB/c 3T3 clone A31 cells were cultured for 48 hours with the NPs, and then, cytotoxicity was evaluated by neutral red uptake. Then, a dose-response curve that fit the Hill function was generated for each experiment. The LD₅₀ value was calculated using the formula $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$ ($R^2 = 0.325$). A) The cytotoxic effects of SiO₂NPs: Hill function curve, IC values, LD₅₀ and R² for the evaluation of the cytotoxic effects of SiO₂NPs. Values are expressed as the means \pm standard deviations ($n=4$). B) Cytotoxic effects of RBITC-SiO₂NPs: Hill function curve, IC values, LD₅₀ and R² for the

evaluation of the cytotoxic effects of RBITC-SiO₂NPs. Values are expressed as the means±standard deviations (n=3); C) Comparison of IC values for SiO₂NPs and RBITC-SiO₂NPs. No significant differences were found between the IC values.

7.1.5.3 Hormesis may be induced by SiO₂NPs

When cell viability was assessed by NRU, it was possible to detect a cellular phenomenon caused by SiO₂NP exposure. Therefore, in order to evaluate this phenomenon, SiO₂NPs concentrations from 4.7-7750 µg/ml were considered and NRU was performed. The results demonstrated that SiO₂NPs led to a biphasic dose response (Figure 3). At high concentrations, SiO₂NPs led to cell death as shown (Figure 2A; Figure 3). However, at low concentrations, an increase in cell viability was detected (Figure 3), suggesting that cell proliferation is stimulated. In hormesis, there is a low-dose stimulation, or beneficial effect, and a high dose inhibition, or toxic effect, which are adaptive responses of cells to moderate stress (Mannerström et al., 2016). Therefore, another interesting finding about these NPs is that SiO₂NPs caused hormetic effects in the BALB/c 3T3 cells.

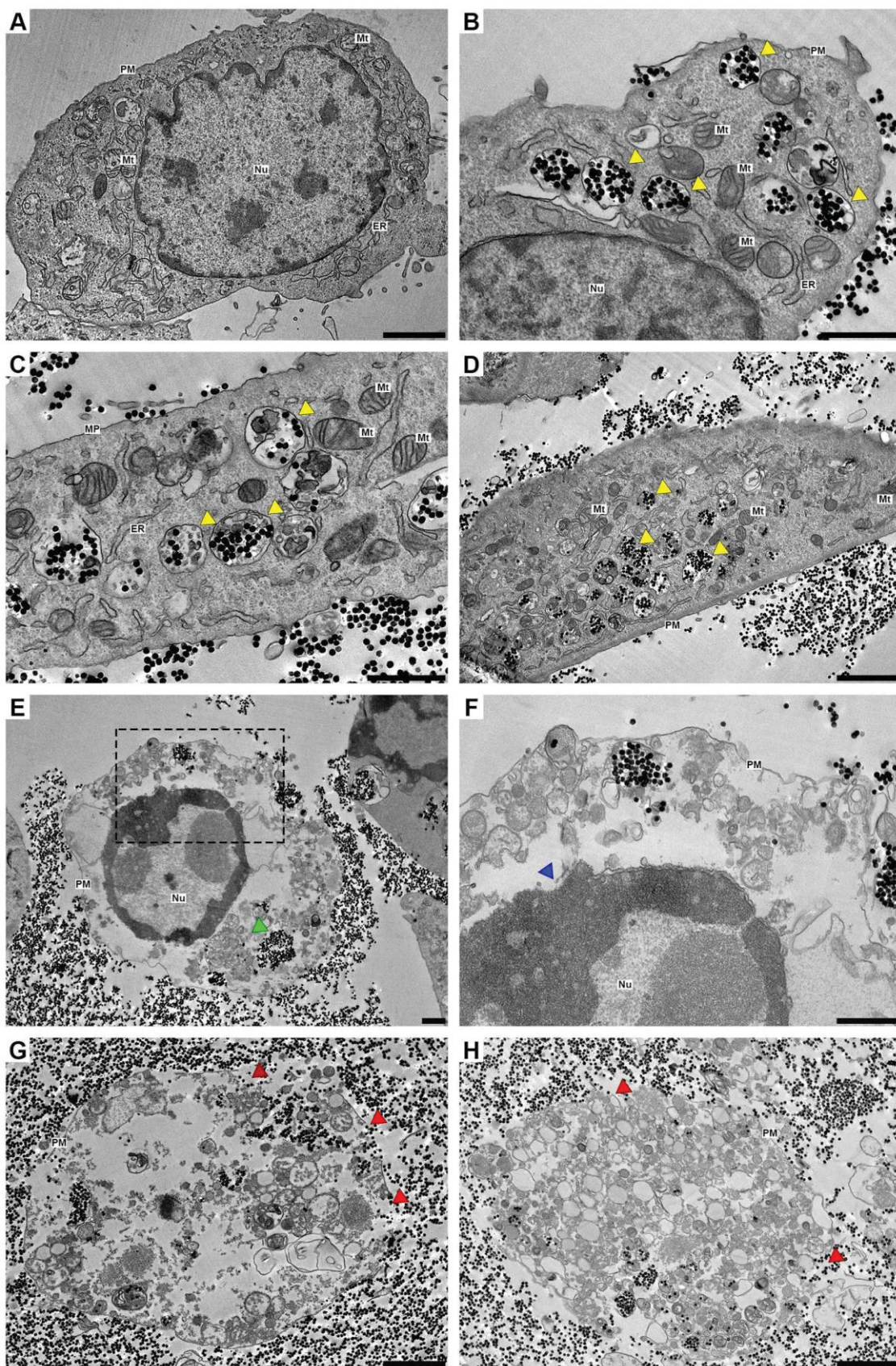


SiO₂NPs paper - Figure 3: SiO₂NPs led to a biphasic dose response (hormesis) in 3T3 cells. Cell viability was measured by neutral red uptake after 48 hours of exposure to SiO₂NPs at different

concentrations. The dose response was determined for each experiment. One-way ANOVA with Dunnett's posttest was used. At high concentrations, a decrease in cell viability was observed. At low concentrations, an increase in cell viability was detected. *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$.

7.1.5.4 *SiO₂NP uptake*

We also investigated how SiO₂NPs interacted with BALB/c 3T3 cells at the ultrastructural level. For the assessment, we exposed 3T3 cells to three different SiO₂NP concentrations: 465.1 µg/mL (a noncytotoxic concentration found in the cell viability assay) (Figure 4B), 1129.1 µg/mL (a noncytotoxic concentration that led to an increase in cell viability - hormesis) (Figure 4C) and 1986.39 µg/mL (IC₅₀ concentration) (Figure 4D, 4E, 4F, 4G and 4H). When both noncytotoxic concentrations (465.1 µg/mL, 1129.1 µg/mL) (Figure 4B and 4C) and the IC₅₀ concentration were used (1986.39 µg/mL) (Figure 4D), many SiO₂NPs were found inside and outside the cells. Internalization occurred at all concentrations, and SiO₂NPs were found inside cytoplasmic vacuole-like structures (Figure 4B, 4C and 4D). At the IC₅₀ concentration, most of the cells had preserved ultrastructure (Figure 4D); however, a few were found with a ruptured plasma membrane (Figure 4F), disappearing organelles and a greatly damaged endomembrane system (Figure 4E, 4G and 4H). These morphologic features are typical of necrotic cell death (Mahto et al., 2011). Although the TEM technique is not a quantitative methodology, it is considered the gold standard technique for the qualitative evaluation of cell death mechanisms (Wlodkowic et al. 2011).



SiO₂NPs paper - Figure 4: 3T3 cells exposed to SiO₂NPs do not present ultrastructure changes in comparison with control cells, but at higher concentration, a few present morphologic features typical of necrosis. The analysis by transmission electron microscopy showed that, at low doses (465,1 $\mu\text{g/mL}$ and 1129,1 $\mu\text{g/mL}$), 3T3 are tolerant to SiO₂NPs and do not present with significant cell damage or alteration at the ultrastructural level (B, C) in comparison with the negative control

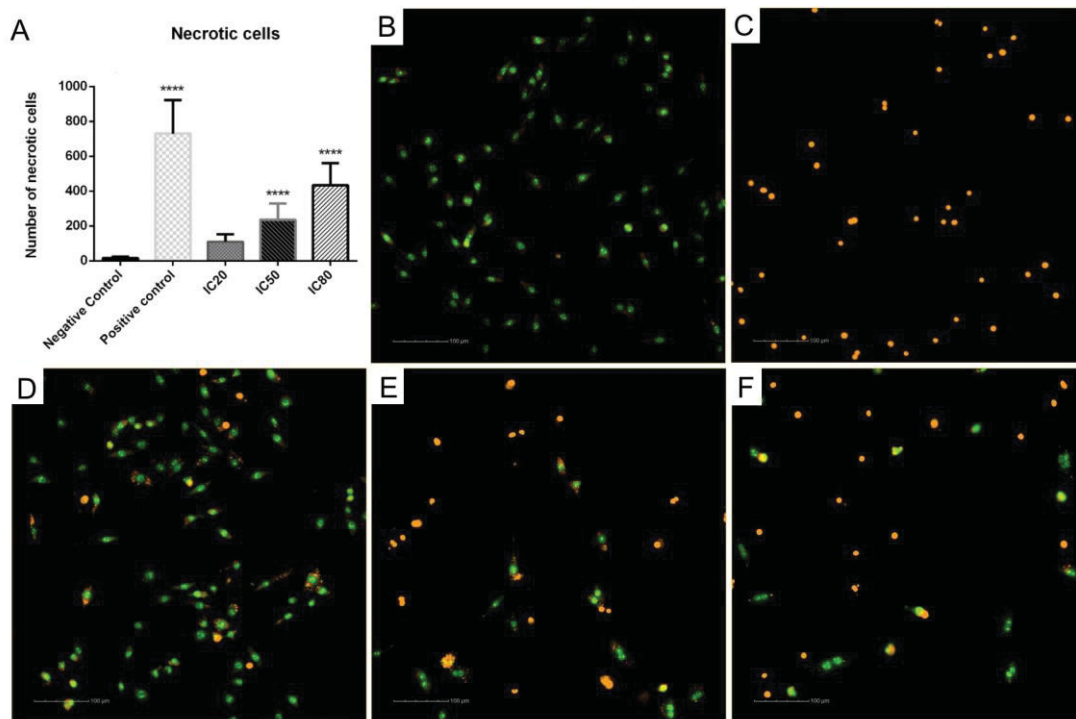
(A). At both noncytotoxic concentrations evaluated (B = 465.1 $\mu\text{g/mL}$ and C = 1129.1 $\mu\text{g/mL}$), SiO₂NPs accumulate in the cytoplasm in vacuole-like structures (yellow arrowheads). When the IC₅₀ dose was applied (1986.39 $\mu\text{g/mL}$), for most of the cells, the ultrastructure was preserved (D), and a few cells were clearly undergoing a necrotic process (E, F, G, H). We identified cells with greatly damaged cytoplasm and endomembrane system (E, green arrowhead). At a high magnification of the demarcated area (F), it was also possible to observe the rupture of the nuclear membrane (blue arrowhead). Cells in later stages of necrosis, with disrupted plasma membranes and released cytoplasmic content in the extracellular space, were also observed (G, H, red arrowheads). A) Negative control (3T3 cells without treatment). B) 3T3 cells exposed to a noncytotoxic concentration of SiO₂NPs (465.1 $\mu\text{g/mL}$). C) 3T3 cells exposed to a noncytotoxic concentration of SiO₂NPs (1129.1 $\mu\text{g/mL}$). D, E, F, G, H) 3T3 cells exposed to the IC₅₀ concentration (1986.39 $\mu\text{g/mL}$). Scale bar = 2 μm in A, D, G and H. Scale bar = 1 μm in B, C, E and F. Mt=Mitochondria; Nu=nucleus; PM=plasmatic membrane; and ER=endoplasmic reticulum.

7.1.5.5 Cell necrosis induced by SiO₂NPs

Once we observed typical cell death features in the IC₅₀ concentration (Figure 4E, 4F, 4G and 4H), our next aim was to investigate the cell death mechanism that was triggered by SiO₂NPs. First, we assessed whether apoptosis was responsible for the reduction of cell viability by conducting a TUNEL assay after 24 hours of exposure. The intensity ratio of apoptotic cells was determined as follows: negative control (no SiO₂NP exposure) = 0.9 ± 0.11 ; positive control (DNase) = 2.6 ± 0.99 ; IC₂₀ = 1.17 ± 0.25 ; IC₅₀ = 1.23 ± 0.32 ; and IC₈₀ = 1.23 ± 0.30 . Therefore, the ratio of apoptotic cells in SiO₂NP-exposed cells was not different from that in the negative control (no NP exposure), suggesting that apoptosis is not the mechanism that leads to cell death by SiO₂NPs (Figure S1).

Once apoptosis was not detected, we aimed to corroborate the findings revealed previously by TEM (necrosis). For that purpose, cells were exposed to SiO₂NPs for 24 hours, and ethidium bromide/acridine orange differential staining was performed (Figure 5). In this evaluation, cells positive for ethidium bromide are considered necrotic (Figure 5C). The number of necrotic cells was determined as follows: negative control (no SiO₂NP exposure) = 16.39 ± 7.88 (Figure 5B); positive control (hydrogen peroxide) = 730.50 ± 192.55 (Figure 5C); IC₂₀ =

109.50±42.98 (Figure 5D); IC_{50} = 236.33±93.35 (Figure 5E); and IC_{80} = 433.33±127.80 (Figure 5F), indicating that SiO₂NPs lead to BALB/c 3T3 cell death by necrosis (Figure 5A).



SiO₂NPs paper - Figure 5: SiO₂NPs induce necrosis in 3T3 cells in a dose-dependent manner. Cells were exposed to IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ concentrations of SiO₂NPs for 24 hours and then assessed by ethidium bromide (EB) /acridine orange (AO) differential staining. Viable cells present with the nucleus stained in green and the cytoplasm stained in orange, a characteristic of the AO dye. A) %Necrotic cells, with a compromised nuclear membrane, have a nucleus intensely stained in orange, a characteristic of the EB dye. B) Negative control (cells without treatment). C) Positive control (hydrogen peroxide). D) IC₂₀ concentration. E) IC₅₀ concentration. F) IC₈₀ concentration. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test: **** p<0.001.

7.1.6 DISCUSSION

Nanoparticles have attracted much attention in industrial and medical fields in recent years. However, adverse effects of NPs on biological systems and cellular components have been reported (Fard et al., 2015). Therefore, understanding the interactions of NPs with cells has become essential for fully exploring the biomedical applications of NPs, especially with regard to drug delivery (Adjei et al., 2014).

Also, one of the main challenges in nanotechnology is the production and design of homogeneous nanoparticles. The preparation of nanoparticles in a reproducible and scalable way is a key step for industrial application (Rietscher et al., 2014). Since, cytotoxicity of NPs is size-dependent (Adjei et al., 2014; Iswayra et al., 2016; Kim et al., 2014; Kim et al., 2015; Pan et al., 2012; Vicente et al., 2017), nanoparticles with a low dispersity and homogeneous size represent promising tools for industrial applications.

Silica nanoparticles (SiO_2NPs) have been extensively studied in recent years, and increasing applications have been found for them in both biomedical and biotechnological fields (Mohamed et al., 2011). Therefore, evaluating their activity within biological systems is highly recommended.

In this study, the cytotoxic effects of two types of homogeneous 100-nm SiO_2NPs (with and without a fluorescent label) were assessed in BALB/c 3T3 cells. We showed that they do not differ in regard to cytotoxic effects. Additionally, BALB/c 3T3 cell death only occurred at very high concentrations (more than 1 mg/ml). Many *in vitro* studies have shown that SiO_2NPs cause low toxicity (Uboldi et al., 2012; Hsiao et al., 2014; Izak-Nau et al., 2013; Manneströem et al., 2016). In 2013, Izak-Nau et al. assessed the cytotoxic effects of 50-nm SiO_2NPs in

different neural tissue-type cells and concluded that NPs only lead to cell death at very high particle doses. In 2016, Manneström et al. evaluated the cytotoxic effects of many types of NPs (including two types of mesoporous SiO₂NPs) through conventional methodologies for toxicity evaluation, including neutral red uptake with BALB/c 3T3 cells (OECD Guideline 129); however, the IC₅₀ was not calculated in this study. Ubaldi et al. (2012) also demonstrated that SiO₂NPs did not cause any cytotoxic or genotoxic damage in BALB/c 3T3 cells at concentrations up to 100 µg/ml. Also, in 2010, Sohaebuddin et al. indicated that 30nm-SiO₂NPs were cytotoxic to 3T3 fibroblasts, more cytotoxic to hT bronchial epithelial cells and even more cytotoxic to RAW macrophages in concentrations from 100-1000 µg/ml, demonstrating that cytotoxicity is also cell-dependent. Even though BALB/c 3T3 cells are not human cells, they have a great importance when it comes to cytotoxicity assays. These cells consist in a reference cell line for *in vitro* cytotoxicity evaluations (ICCVAM, 2006c) and they have been extensively used even for NPs cytotoxicity assessments (Mannerström et al., 2016; Stoccoro et al., 2016; Ubaldi et al., 2016). Also, by using these cells, it is possible to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity tests (ICCVAM, 2001).

It is the first time that IC₂₀, IC₅₀ and IC₈₀ concentrations of SiO₂NPs were demonstrated for SiO₂NPs with a validated OECD-based methodology and a reference cell line previously used for *in vitro* cytotoxicity (ICCVAM, 2006c). It is also the first time that the GHS category has been predicted for these NPs. According to the LD₅₀, it is possible to rank and categorify a substance according to the Global Harmonized System (GHS). The GHS has five categories for acute toxicity according to the severity of the hazard (US EPA, 2004). Through our results, we have indicated that SiO₂NPs might belong to GHS category 4 for

toxicity because the LD₅₀ predicted for both NPs was approximately 1700 mg/kg. The GHS for acute toxicity indicates that category 4 substances are associated with an LD₅₀ ranging from 300-2000 mg/kg and by this result we were able to indicate the starting doses for the acute oral systemic toxicity tests, according to OECD Guideline 129 (OECD, 2010). These substances are indicated as harmful but not toxic or fatal (UN, 2011). A previous study performed by our group revealed that bismuth nanoparticles are also categorifed as GHS category 4 (Reus et al., 2018). Propranolol HCl and sodium dodecyl sulfate (SDS) are also category 4 substances (Scanu et al., 2011, Abud et al., 2015). In 2014, Lee et al. evaluated the tissue distribution and excretion kinetics of orally administered SiO₂NPs in a single dose of 500 or 1000 mg/kg to rats; the kidneys, liver, lungs and spleen were found to be the target organs, and no acute toxicity was exhibited at those doses. Xie et al. (2010) also investigated the long-term (30 days) tissue distribution and potential toxic effects of intravenously administered SiO₂NPs and found these NPs in the lungs, liver and spleen, indicating liver injury because of the endocytosis by macrophages. In 2017, Chan et al. investigated the *in vivo* toxic effects of SiO₂NPs in doses up to 300 mg/kg in mice; all the animals survived and behaved normally after intravenous administration of the NPs. In addition, in 2011, Liu et al. evaluated the toxic effects of the systemic single and repeated dose toxicity and the biodistribution and clearance of mesoporous hollow silica nanoparticles (MHSNs) in mice; for single-dose toxic MHSNs, the LD₅₀ was higher than 1000 mg/kg, and for the repeated dose, low toxicity was observed with MHSN accumulation in the liver and spleen.

Moreover, we also observed that SiO₂NPs can cause hormetic effects; these phenomena were already associated with NPs (Nascarella & Calabrese,

2012), including SiO₂NPs. In 2016, Mannerström et al. evaluated the applicability of conventional cytotoxicity assays to predict the toxic effects of many types of NPs, including SiO₂NPs; they observed hormetic effects, with an increase in cell viability and mitochondrial activity when cells were exposed to 465 µg/ml of SiO₂NPs. It is important to point out that this is the same concentration that we used in this study, and we observed hormesis. In 2016, Mytych et al. evaluated low doses of nanodiamonds and SiO₂NPs in normal human skin fibroblasts and observed a biphasic dose response in the MTT assay, indicating hormesis.

In this study, we also demonstrated by TEM the interaction between SiO₂NPs and BALB/c 3T3 cells at different concentrations. Many SiO₂NPs were found inside and outside cells, but no ultrastructural changes were observed in most of the cells when nontoxic concentrations were used under our assay conditions. In 2012, Uboldi et al. observed that SiO₂NPs are internalized and located in the cytoplasm of BALB/c 3T3 cells; they concluded that even though SiO₂NPs are internalized, they do not trigger any cytotoxic or genotoxic effects in concentrations up to 100 µg/ml. Some studies have already shown that the mechanism of endocytosis for SiO₂NPs in different cell types is even mediated through clathrin- and caveolin-mediated mechanisms (Hu et al., 2011; Hsiao et al., 2014). In addition, we found that SiO₂NPs accumulated in vacuole-like structures. In 2016, Schütz et al. demonstrated that SiO₂NPs are internalized by HeLa cells and accumulate in lysosomes, resulting in inhibition of autophagy-mediated protein turnover, consequently impacting cell physiology. Additionally, Yanes et al. (2013) showed that SiO₂NPs are exocytosed from cells after uptake; they also provided evidence that lysosomes are involved in this process, as inhibition of lysosomal exocytosis decreased SiO₂NPs exocytosis, and pointed

out the importance of these phenomena in drug delivery. Other studies on different cells have shown TEM figures very similar to those from our study, with SiO₂NP accumulation in vacuole-like structures (Duan et al., 2013; Kim et al., 2017; Kretowski et al., 2017; Park et al., 2016). Together, all these studies indicate that SiO₂NPs are endocytosed and accumulate in vacuoles regardless of cell type.

Even though most of the cells did not present any ultrastructure alteration, a few cells with considerable damage were found. Therefore, we confirmed that necrosis was triggered by SiO₂NPs when IC₅₀ concentrations were used in cells. Regarding the cell death mechanism, studies have shown contradictory evidence. In 2017, Kretowski et al. studied the effect of SiO₂NPs on two different types of glioblastoma cells, LBC3 and LN-18 cells; in the LBC3 cells, they noticed the induction of apoptosis and necrosis, while in the LN-18 cells, only necrosis was detected. Other studies have also shown that in HepG2 cells, SiO₂NPs induce apoptosis through a mitochondrial-dependent pathway triggered by oxidative stress (Liu et al., 2011; Ahmad et al., 2012) and are regulated through p53, bax/bcl-2 and caspase pathways (Ahmad et al., 2012). However, Duan et al. (2013) demonstrated that SiO₂NPs lead to both apoptosis and necrosis in HUVECs, but with much higher necrosis rates than apoptosis rates. Altogether, these results demonstrate the heterogeneity of the cell death mechanism.

In conclusion, this study shows that SiO₂NPs are only toxic at high concentrations and induce a biphasic dose response cytotoxicity. BALB/c 3T3 cells exposed to lower and noncytotoxic concentrations of SiO₂NPs showed increased cell viability, while at high and toxic concentrations, cells were

induced to death by necrosis. However, even at lower concentrations, SiO₂NPs were internalized by cells and accumulated in vacuole-like structures.

We have successfully employed an OECD-based methodology with BALB/c 3T3 cells, which is a reference mammalian cell line for cytotoxicity evaluations. However, for future works, more specific cell lines should be used to evaluate the effect of SiO₂NPs in human cells, especially liver cells, once it has been shown that SiO₂NP-induced toxicity is mainly linked to this organ. Therefore, more studies should be performed to elucidate the additional mechanisms of toxicity induced by SiO₂NPs in biological systems.

7.1.7 Acknowledgments

This study was supported by Fundação Araucária, CAPES (PhD scholarship), PPSUS (Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS grant number 20/2017) Fundação Araucária-PR / SESA-PR/ CNPq/ MS-Decit. B.D. received a fellowship from CNPq, T.L.R. from CAPES and A.C.P.C. from Fundação Araucária. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for the use of the flow cytometry and microscopy facilities at Carlos Chagas Institute – Fiocruz/PR. M.B.C. and I.R.R. acknowledge the financial support of the São Paulo Research Foundation – FAPESP (processes 2015/25406-5 and 2017/21318-0). M.B.C. acknowledges CNPq for a productivity fellowship.

The authors report no potential conflicts of interest, including financial interests.

7.1.8 REFERENCES

Abud, A. P., Zych, J., Reus, T. L., Kuligovski, C., de Moraes, E., Dallagiovanna, B. and de Aguiar, A. M. (2015) 'The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test', *Regul Toxicol Pharmacol*, 73(3), pp. 992-8.

Adjei, I. M., Sharma, B. and Labhasetwar, V. (2014) 'Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity', *Adv Exp Med Biol*, 811, pp. 73-91.

Ahmad, J., Ahamed, M., Akhtar, M. J., Alrokayan, S. A., Siddiqui, M. A., Musarrat, J. and Al-Khedhairi, A. A. (2012) 'Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2', *Toxicol Appl Pharmacol*, 259(2), pp. 160-8.

Azhdarzadeh, M., Saei, A. A., Sharifi, S., Hajipour, M. J., Alkilany, A. M., Sharifzadeh, M., Ramazani, F., Laurent, S., Mashaghi, A. and Mahmoudi, M. (2015) 'Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology', *Nanomedicine (Lond)*, 10(18), pp. 2931-52.

Burns, A., Sengupta, P., Zedayko, T., Baird, B. and Wiesner, U. (2006) 'Core/Shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: towards single-particle laboratories', *Small*, 2(6), pp. 723-6.

Capeletti, L. B., Oliveira, L. F., Gonçalves, K. A., Oliveira, J. F. A., Saito, A., Kobarg, J., Santos, J. H. Z., Cardoso, M. B. (2014) 'Tailored Silica-Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Toxicity', *Langmuir*, 30, pp. 7456-7464.

Chan, W. T., Liu, C. C., Chiang Chiau, J. S., Tsai, S. T., Liang, C. K., Cheng, M. L., Lee, H. C., Yeung, C. Y. and Hou, S. Y. (2017) 'In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice', *Int J Nanomedicine*, 12, pp. 3421-3432.

- Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Zhou, X., Huang, P. and Sun, Z. (2013) 'Toxic effect of silica nanoparticles on endothelial cells through DNA damage response via Chk1-dependent G2/M checkpoint', *PLoS One*, 8(4), pp. e62087.
- Elsaesser, A. and Howard, C. V. (2012) 'Toxicology of nanoparticles', *Adv Drug Deliv Rev*, 64(2), pp. 129-37.
- Fard, J.K., Jafari, S., Eghbal, M.A. (2015) 'A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles', *Adv Pharm Bull*, 5(4), pp. 447-454.
- Gomes, M.C., Cunha, A., Trindade, T., Tomé, J.P.C. (2016) 'The Role of Surface Functionalization of Silica Nanoparticles for Bioimaging', *J Innov Opt Health Sci*, 9(4), pp. 1-16.
- Hrouzek, P., Kapuścik, A., Vacek, J., Voráčková, K., Paichlová, J., Kosina, P., Voloshko, L., Ventura, S. and Kopecký, J. (2016) 'Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine in vitro cell models', *Ecotoxicol Environ Saf*, 124, pp. 177-185.
- Hsiao, I., Gramatke, A.M., Joksimovic, R., Sokolowski, M., Gradzielski, M., Haase, A. (2014) 'Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles', *J Nanomed Nanotechnol*, 5(6), pp.1-10.
- Hu, L., Zhengwei, M., Zhang, Y., Gao, C. (2011) 'Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells', *J Nanosc Let*, 1 (1), pp.1-16.
- ICCVAM. (2001) 'Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity'. Available at: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf
- ICCVAM. (2006b) 'Background Review Document: in Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity', 2. Available at:

http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/brdvol2_nov2006.pdf.

ICCVAM. (2006c) 'Recommended Test Method Protocol: BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method'. Available at: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmer.htm.

ICCVAM. (2006e). 'Test Method Evaluation Report (TMER): in Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing'. Available at: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf.

Izak-Nau, E., Voetz, M., Eiden, S., Duschl, A., Puentes, V.F. (2013) 'Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation', Part Fibre Toxicol, 10(56), pp. 1-12.

Kim, J. Y., Park, J. H., Kim, M., Jeong, H., Hong, J., Chuck, R. S. and Park, C. Y. (2017) 'Safety of Nonporous Silica Nanoparticles in Human Corneal Endothelial Cells', Sci Rep, 7(1), pp. 14566.

Krętowski, R., Kusaczuk, M., Naumowicz, M., Kotyńska, J., Szynaka, B. and Cechowska-Pasko, M. (2017) 'The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines', Nanomaterials (Basel), 7(8).

Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D. and Schnekenburger, J. (2009) 'Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: limitations and challenges', Eur J Pharm Biopharm, 72(2), pp. 370-7.

Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. and Kioussi, C. (2012) 'Detection of apoptosis by TUNEL assay', Methods Mol Biol, 887, pp. 41-7.

- Larson, D. R., Ow, H., Vishwasrao, H. D., Heikal, A. A., Wiesner, U., Webb, W. W. (2008) 'Silica Nanoparticle Architecture Determines Radiative Properties of Encapsulated Fluorophores', *Chem. Mater.*, 20, pp. 2677-2684.
- Lee, J. A., Kim, M. K., Paek, H. J., Kim, Y. R., Lee, J. K., Jeong, J. and Choi, S. J. (2014) 'Tissue distribution and excretion kinetics of orally administered silica nanoparticles in rats', *Int J Nanomedicine*, 9 Suppl 2, pp. 251-60.
- Leirose, G. D. S., Vardoso, M. B. (2011) 'Silica-Maltose Composites: Obtaining Drug Carrier Systems Through Tailored Ultrastructural Nanoparticles', *Pharmaceutical Nanotechnology*, 100, pp. 2826-2829.
- Liu, T., Li, L., Teng, X., Huang, X., Liu, H., Chen, D., Ren, J., He, J. and Tang, F. (2011) 'Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice', *Biomaterials*, 32(6), pp. 1657-68.
- Mahto, S.K., Vinod, T.P., Kim, J., Rhee, S.W. (2011). 'Cytotoxic Potentials of Tellurium Nanowires in BALB/3T3 Fibroblast Cells', *Bull Korean Chem Soc*, 32(9), pp. 3405-3410).
- Mannerström, M., Zou, J., Toimela, T., Pyykkö, I. and Heinonen, T. (2016) 'The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes', *Toxicol In Vitro*, 37, pp. 113-120.
- McGahon, A.J., Martin, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.R. (1995). 'The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro', *Methods Cell Biol*, 46, pp. 153–185.
- Mohamed, B. M., Verma, N. K., Prina-Mello, A., Williams, Y., Davies, A. M., Bakos, G., Tormey, L., Edwards, C., Hanrahan, J., Salvati, A., Lynch, I., Dawson, K., Kelleher, D. and Volkov, Y. (2011) 'Activation of stress-related signalling

pathway in human cells upon SiO₂ nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity', *J Nanobiotechnology*, 9, pp. 29.

Mytych, J., Wnuk, M. and Rattan, S. I. (2016) 'Low doses of nanodiamonds and silica nanoparticles have beneficial hormetic effects in normal human skin fibroblasts in culture', *Chemosphere*, 148, pp. 307-15.

OECD. (2010) 'Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129. ' Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd129.pdf>

Oliveira, J. F. A., Scheffer, F., Landis, R. F., Teixeira-Neto, E., Rotello, V. M., Cardoso, M. B. (2018) 'Dual Functionalization of Nanoparticles for Generating Corona-Free and Non-Cytotoxic Silica Nanoparticles', 10(49), pp. 41917-41923.

Park, J. H., Jeong, H., Hong, J., Chang, M., Kim, M., Chuck, R. S., Lee, J. K. and Park, C. Y. (2016) 'The Effect of Silica Nanoparticles on Human Corneal Epithelial Cells', *Sci Rep*, 6, pp. 37762.

Reus, T. L., Machado, T. N., Bezerra, A. G., Marcon, B. H., Paschoal, A. C. C., Kuligovski, C., de Aguiar, A. M. and Dallagiovanna, B. (2018) 'Dose-dependent cytotoxicity of bismuth nanoparticles produced by LASiS in a reference mammalian cell line BALB/c 3T3', *Toxicol In Vitro*, 53, pp. 99-106.

Saha, M. (2009) 'Nanomedicine: promising tiny machine for the healthcare in future-a review', *Oman Med J*, 24(4), pp. 242-7.

Scanu, M., Mancuso, L. and Cao, G. (2011) 'Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests', *Toxicol In Vitro*, 25(8), pp. 1989-95.

Schütz, I., Lopez-Hernandez, T., Gao, Q., Puchkov, D., Jabs, S., Nordmeyer, D., Schmudde, M., Rühl, E., Graf, C. M. and Haucke, V. (2016) 'Lysosomal

Dysfunction Caused by Cellular Accumulation of Silica Nanoparticles', *J Biol Chem*, 291(27), pp. 14170-84.

Stoccoro, A., Di Buccianico, S., Uboldi, C., Coppedè, F., Ponti, J., Placidi, C., Blosi, M., Ortelli, S., Costa, A. L. and Migliore, L. (2016) 'A panel of in vitro tests to evaluate genotoxic and morphological neoplastic transformation potential on Balb/3T3 cells by pristine and remediated titania and zirconia nanoparticles', *Mutagenesis*, 31(5), pp. 511-29.

The Project on Emerging Nanotechnologies (2018). Available at: <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=bismuth>.

Thorne, D., Kilford, J., Payne, R., Haswell, L., Dalrymple, A., Meredith, C. and Dillon, D. (2014) 'Development of a BALB/c 3T3 neutral red uptake cytotoxicity test using a mainstream cigarette smoke exposure system', *BMC Res Notes*, 7, pp. 367.

Uboldi, C., Giudetti, G., Broggi, F., Gilliland, D., Ponti, J. and Rossi, F. (2012) 'Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts', *Mutat Res*, 745(1-2), pp. 11-20.

Uboldi, C., Urbán, P., Gilliland, D., Bajak, E., Valsami-Jones, E., Ponti, J. and Rossi, F. (2016) 'Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts', *Toxicol In Vitro*, 31, pp. 137-45.

UN (United Nations). 'Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) Forth Revised Edition'. Available at: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf.

US EPA (United States Environmental Protection Agency). 'CHEMICAL HAZARD CLASSIFICATION AND LABELING : COMPARISON OF OPP REQUIREMENTS AND THE GHS' (2004). Available at:<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ghscriteria-summary.pdf>.

Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z. (2011) 'Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death', *Methods Cell Biol*, 103, pp. 55-98.

Xie, G., Sun, J., Zhong, G., Shi, L., Zhang, D. 'Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice' (2010), *Arch Toxicol*, 84, pp.183-190.

Yanes, R. E., Tarn, D., Hwang, A. A., Ferris, D. P., Sherman, S. P., Thomas, C. R., Lu, J., Pyle, A. D., Zink, J. I. and Tamanoi, F. (2013) 'Involvement of lysosomal exocytosis in the excretion of mesoporous silica nanoparticles and enhancement of the drug delivery effect by exocytosis inhibition', *Small*, 9(5), pp. 697-704.

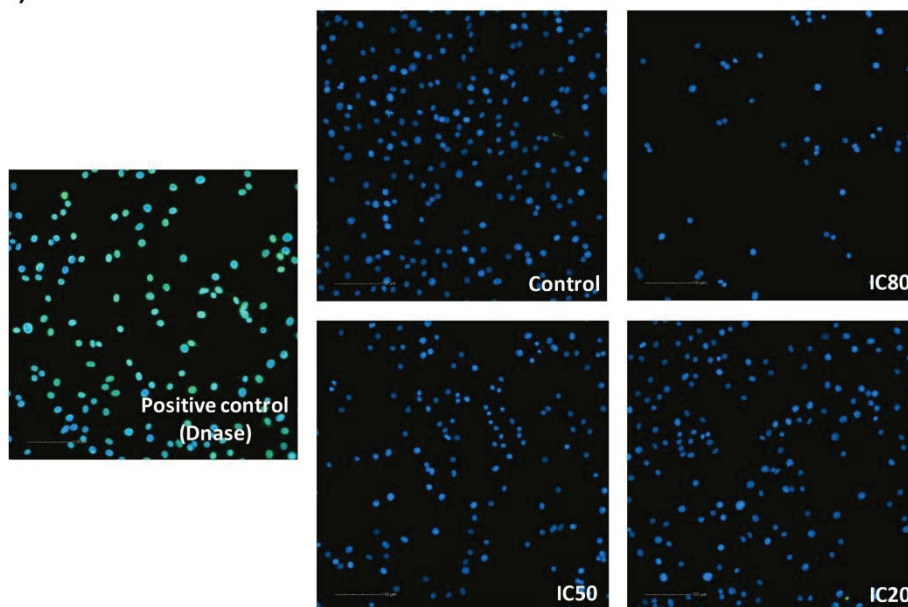
Zhang, W., Abou El-Reash, Y. G., Ding, L., Lin, Z., Lian, Y., Song, B., Yuan, J. and Wang, X. D. (2018) 'A lysosome-targeting nanosensor for simultaneous fluorometric imaging of intracellular pH values and temperature', *Mikrochim Acta*, 185(12), pp. 533.

Zhao, X., Hilliard, L. R., Mechery, S. J., Wang, Y., Bagwe, R. P., Jin, S. and Tan, W. (2004) 'A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(42), pp. 15027-32.

Zou, J., Feng, H., Mannerström, M., Heinonen, T. and Pyykkö, I. (2014) 'Toxicity of silver nanoparticle in rat ear and BALB/c 3T3 cell line', *J Nanobiotechnology*, 12, pp. 52.

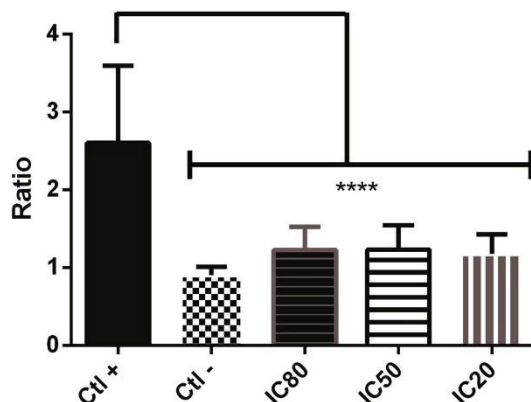
7.1.9 SUPPLEMENTARY MATERIAL

A)



TUNEL

B)



SiO₂NPs paper - Figure S 1: SiO₂NPs do not induce apoptosis in 3T3 cells. 3T3 cells were exposed to IC20, IC50 and IC80 concentrations of SiO₂NPs for 24 hours, and then apoptosis was assessed by TUNEL staining (green). Nuclei were stained with Hoechst (blue). A) Representative images of Positive Control (DNase), Control (without SiO₂NP exposure), and cells exposed to IC80, IC50 and IC20 concentrations. Images were acquired at 20x magnification. Twenty-five pictures of each well were captured, and the number of nuclei and positive cells was quantified (three independent experiments). B) Percentage of apoptotic cells in all conditions. Values were expressed as the ratio of positive cells divided by the number of cells. For statistical analysis, one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparisons test were used: **** p<0.001.

8 DISCUSSÃO GERAL

Nanopartículas têm sido amplamente utilizadas em diferentes campos da medicina à indústria, acarretando em uma exposição cada vez maior aos seres humanos (ABUDAYYAK et al., 2017). Sendo assim, a avaliação da segurança no uso destas NPs é de extrema necessidade. Informações sobre seus potenciais tóxicos, bem como os mecanismos de toxicidade são extremamente importantes. O entendimento da interação entre NPs e sistemas biológicos é um fator chave para a aplicação de NPs de forma segura e eficaz (RAHMAN et al., 2013).

Os resultados obtidos através da realização deste trabalho fornecem informações relevantes principalmente em relação aos aspectos biológicos decorrentes da interação de NPs (ouro, bismuto e sílica) e células BALB/c 3T3. O trabalho buscou avaliar diferentes nanopartículas com possível aplicação em produtos de interesse médico. Desta forma, a primeira etapa englobou a síntese e caracterização de NPs de ferro, ouro, bismuto e sílica.

As FeNPs produzidas por síntese química apresentaram um perfil de tamanho e distribuição não homogêneo ao longo das produções, inviabilizando a realização das avaliações biológicas. A padronização e manutenção do tamanho/dispersão das partículas é crucial, uma vez que a toxicidade é tamanho-dependente (ISWAYRA et al., 2016; KIM et al., 2015; PAN, BARTNECK & JAHNEN-DECHENT, 2012). Partículas da mesma origem e com o mesmo processo de síntese, porém com tamanhos diferentes, podem apresentar respostas completamente distintas (KIM et al., 2015). As especificidades das NPs como composição química, tamanho, formato ou morfologia, carga e área podem influenciar a sua atividade e efeitos biológicos. NPs possuem características específicas (tamanho, carga, morfologia, composição química), as quais são responsáveis pelos seus efeitos. Sendo assim, uma característica específica pode dar origem tanto a uma partícula totalmente segura quanto a uma perigosa (mais reativa, que leve a maiores danos celulares, etc) (ZORODDU et al., 2014), portanto a manutenção da homogeneidade de um tamanho específico de partícula se faz essencial para que sua toxicidade seja de fato avaliada de forma acurada e mesmo para que possa ser viabilizada para uso e aplicação industrial. O tamanho das NPs consiste em um dos parâmetros

mais importantes em relação ao seu uso para *drug delivery* (RIETSCHER et al., 2014). É importante salientar que os diferentes métodos de caracterização de NPs, visando obter uma maior homogeneidade na produção estão sendo discutidos e avaliados, tendo implicações nos debates atuais para a definição de guidelines neste campo (HOLE et al., 2013). A preparação de NPs de tamanho controlado de forma reprodutível e escalonável ainda é um desafio, porém um passo-chave para sua aplicação industrial (RIETSCHER et al., 2014).

As AuNPs produzidas por ablação a laser tiveram a sua citotoxicidade avaliada de forma prévia, não sendo possível no entanto, realizar o número de avaliações suficientes para análise estatística pelo fato de estas NPs não terem mantido a sua estabilidade ao longo das produções. Os resultados demonstrados através do presente trabalho indicaram valores de IC_{50} por volta de 65 $\mu\text{g/ml}$ – concentrações maiores que as encontradas para BiNPs e menores que para SiO_2 NPs. Além disso, os valores de DL_{50} preditos foram estimados por volta de 506 mg/kg – valor predito maior que para BiNPs e menor que para SiO_2 NPs. Ao predizer a classe de toxicidade GHS, sugere-se que as AuNPs se enquadrem na classe 4 de toxicidade GHS, assim como substâncias muito conhecidas como o SDS e propranolol (SCANU et al., 2011, ABUD et al., 2015). É importante salientar, no entanto, que muito embora a classe GHS predita estimada para AuNPs ($n=2$) seja a mesma que para as BiNPs e SiO_2 NPs avaliadas no presente trabalho (classe 4), ter a predição na mesma classe de toxicidade GHS não significa que elas possam ser equiparáveis em relação a toxicidade, uma vez que se trata de uma classe de toxicidade com uma janela bastante ampla ($300 < DL_{50} \leq 2000 \text{ mg/kg}$). Esta informação torna-se ainda mais clara nos resultados de BiNPs e SiO_2 NPs, os quais serão discutidos nas próximas páginas. Em 2016, Hashimoto e colaboradores avaliaram os efeitos de AuNPs em células L929 e não observaram efeitos citotóxicos em concentrações até 400 $\mu\text{g/ml}$. Mateo e colaboradores (2014) avaliaram a citotoxicidade de AuNPs de 3 diferentes tamanhos em células HL-60 e HepG2. Os resultados demonstraram valores de IC_{50} entre 14-20 $\mu\text{g/ml}$. Favi e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade nanoesferas de ouro e nanoestrelas de ouro em fibroblastos e células endoteliais; os valores de IC_{50} para nanoesferas foram de 13,6-27,7 $\mu\text{g/ml}$, enquanto para nanoestrelas não foi possível calcular este valor

devido às curvas dose-respostas não terem sido completas. O ouro em escala *bulk* é considerado não-tóxico, inerte e biocompatível (PAN et al., 2009), no entanto, os estudos citados acima nos permitem afirmar que o mesmo não ocorre para o ouro em escala nanométrica; AuNPs podem levar a efeitos citotóxicos, incluindo necrose celular e dano mitocondrial (PAN et al., 2009), morte celular (FAVI et al., 2015; HASHIMOTO et al., 2016; MATEO et al., 2014) ou mesmo mudanças na metilação e hidroximetilação do DNA (SENUT et al., 2016). Recentemente, a OMS levantou essa questão como foco na saúde ocupacional e organizou os dados relativos aos ensaios realizados em conformidade com as guias-teste da OECD, referentes a 11 nanomateriais, incluindo ouro. Concluindo que para AuNPs (14 nm), apesar das informações para a maioria dos estudos serem consideradas limitadas, estas NPs podem ser classificadas como categoria 1 para toxicidade órgão-específica por inalação repetida com forte evidência, produzindo toxicidade significativa em humanos (LEE et al., 2017). Portanto, a avaliação da toxicidade de AuNPs reprodutíveis e escalonáveis que estejam sendo avaliadas para o seu emprego na indústria é de extrema necessidade antes de sua aplicação.

Apesar de desconsiderarmos a continuação dos ensaios com FeNPs e AuNPs, outras duas NPs se mostraram adequadas para realização dos ensaios *in vitro* e continuação do estudo. Abordou-se a síntese, caracterização e interação de BiNPs e células BALB/c 3T3. Foi a primeira vez que BiNPs produzidas por ablação a laser tiveram sua citotoxicidade avaliada. Através dos resultados, observamos que BiNPs produzidas por ablação a laser são redondas e heterogêneas em tamanho. Para permanecerem estáveis, estas NPs necessitam da formação de corona NP-proteína. No presente trabalho, esta corona foi formada através da adição de proteínas tanto provenientes de misturas heterogêneas (SBF), quanto homogêneas (BSA). Considerar a presença e composição da corona proteica é fundamental para estudos de avaliação de interação entre NPs-células, uma vez que a corona mimetiza o que ocorre no microambiente biológico (LUNDQVIST et al., 2008; TREUEL et al., 2015). As coronas proteicas geradas através do contato de NPs com proteínas podem determinar as cascatas imunológicas subsequentes, portanto, é muito importante que se tenha cuidado ao avaliar a citotoxicidade de NPs, uma vez que dependendo da composição, as coronas proteicas podem tanto estimular,

quanto inibir as respostas imunes (LEE et al., 2014). Sendo assim, a pré-incubação das NPs com proteínas pode ser uma estratégia bastante interessante para ajudar a controlar a composição de compostos nanométricos em ambientes biológicos, oferecendo uma vantagem para suas aplicações industriais e biomédicas, uma vez que o comportamento de NPs pode ser alterado de acordo com as moléculas as quais as NPs são expostas (IZAK-NAU et al., 2013).

Através do presente trabalho também foi possível avaliar a citotoxicidade destas BiNPs. Outros trabalhos anteriores já haviam avaliado a citotoxicidade de BiNPs, no entanto, a grande maioria deles realizou a avaliação de NPs de óxido de bismuto (ABUDAYYAK et al., 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2013; LIMAN, 2013), ou até mesmo ferrito de bismuto (Staedler et al., 2015). Além disso, a maior parte deles avaliou BiNPs produzidas por síntese química e em outros modelos celulares (ABUDAYYAK et al., 2017; HERNANDEZ-DELGADILLO et al., 2013; LIU et al., 2017; Staedler et al., 2015). É importante salientar, no entanto, que nenhum destes estudos utilizou células recomendadas por agências regulatórias internacionais para a predição da toxicidade. No presente trabalho, utilizou-se a linhagem celular BALB/c 3T3 para a avaliação de citotoxicidade para estimar as doses iniciais para os testes de toxicidade sistêmica oral aguda, conforme recomendação da OECD *Guideline* 129 (ICCVAM, 2006c; OECD, 2010). Estas células já têm sido utilizadas para a avaliação da citotoxicidade de outros tipos de NPs (MANNERSTRÖM et al., 2016; STOCCORO et al., 2016; UBOLDI et al., 2016). Ao utilizar esta metodologia, foi possível obter os valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, além da extrapolação da DL₅₀ e a classe de toxicidade GHS. Para as BiNPs avaliadas no presente estudo, a DL₅₀ predita foi de 363,3 mg/kg, indicando estas NPs como pertencentes a classe 4 de toxicidade GHS, semelhante a compostos como SDS e propranolol (SCANU et al., 2011; ABUD et al., 2015). Ao comparar a toxicidade do bismuto nanoparticulado com o bismuto em escala *bulk* podemos sugerir que o bismuto nanoparticulado seja mais tóxico que o bismuto metálico. Sano e colaboradores (2005) realizaram um estudo em animais e demonstraram que a DL₅₀ do bismuto metálico é maior que 2000 mg/kg, enquadrando este metal como classe 5 ou 6 de toxicidade GHS.

Os resultados obtidos no presente trabalho também demonstraram que as BiNPs são internalizadas e acumulam-se em estruturas muito semelhantes a lisossomos. Em 2017, Liu e colaboradores realizaram a marcação de células HEK293 com os marcadores lisossomos LAMP1 e LAMP2 e demonstraram que BiNPs colocalizam-se com estes marcadores. Além disso, em 2014, Swy e colaboradores demonstraram através de microscopia eletrônica de transmissão que nanocristais de bismuto encapsulados em PLGA (poli ácido-lático-co-ácido glicólico) também foram encontrados em estruturas semelhantes a lisossomos em fibroblastos. Nossos resultados também sugerem que uma vez internalizadas, estas BiNPs passam a exercer efeitos citotóxicos. Guarnieri e colaboradores avaliaram o comportamento de diferentes tipos de NPs metálicas (ouro, prata e ferro) e demonstraram que o acúmulo intracelular destas NPs metálicas em compartimentos endo-lisossomais foi o principal responsável pela nanotoxicidade, devido a degradação destas NPs e a liberação de metais iônicos *in situ* (GUARNIERI et al., 2014). Ainda em 2014, Sabella e colaboradores descreveram este mecanismo de toxicidade para NPs metálicas denominado “Efeito Cavalo de Tróia aumentado por lisossomos”. Esta denominação ocorre pelo fato da própria maquinaria de sobrevivência e defesa celular (lisossomos) ser a responsável pela geração da toxicidade. Basicamente, este mecanismo de ação ocorre da seguinte forma: NPs metálicas são geralmente internalizadas através de processos de endocitose (mediados por clatrina, caveolina, *lipid rafts*, dentre outros) e são rapidamente confinadas em estruturas vesiculares, endossomos e por final, lisossomos. O pH ácido lisossomal é então responsável por gerar o “Efeito Cavalo de Tróia”, pois com a internalização celular das NPs, os lisossomos passam a liberar íons tóxicos. Estes íons passam então a exercer efeitos tóxicos celulares, como inativação de enzimas, desnaturação de proteínas, danos a organelas e/ou dano lisossomal. Através destas cascatas de toxicidade, há um aumento significativo nos níveis de espécies reativas de oxigênio, culminando em apoptose e dano a membrana plasmática e ao DNA. Já foi demonstrado que o mecanismo de toxicidade para diferentes NPs metálicas relaciona-se com a liberação iônica, ao passo que partículas não liberadoras de íons – como NPs recobertas ou NPs de diamante e sílica – não são perigosas para o ambiente intracelular (SABELLA et al., 2014). Estes trabalhos sugerem que o possível mecanismo de toxicidade envolvido no caso

das BiNPs utilizadas neste trabalho relaciona-se principalmente a origem metálicas destas NPs.

Através de microscopia eletrônica de transmissão, além de demonstrar que estas BiNPs acumularam-se em estruturas semelhantes a lisossomos foi possível observar um dano e estresse celular, devido a presença de vesículas citoplasmáticas e figuras de mielina nas células BALB/c 3T3. Estas figuras relacionam-se a eventos independentes de caspase que estão diretamente relacionados a toxicidade de certos compostos (VEJUX et al., 2007) e processos de autofagia celular (WATANABE et al., 2009). Em 2017, Liu e colaboradores demonstraram que a toxicidade das BiNPs utilizadas naquele estudo relacionava-se ao processo de autofagia celular; no ano seguinte, o mesmo autor demonstrou que a injúria renal em animais causada por BiNPs é relacionada também ao processo de autofagia (LIU et al., 2018). A autofagia celular relacionada a toxicidade já foi reconhecida como um importante mecanismo de morte celular relacionado a toxicidade induzida por vários tipos de NPs, no entanto, o papel da autofagia e seus mecanismos celulares e moleculares na toxicidade de NPs ainda estão de certa forma obscuros. A autofagia pode estar tanto relacionada a sobrevivência celular sob certas condições severas, quanto a morte celular propriamente dita (LI & JU, 2018).

Por fim, demonstrou-se através dos resultados deste trabalho que a morte das células BALB/c 3T3 ocorreu por mecanismo de apoptose e de forma concentração-dependente. Abudayyak e colaboradores (2017) também demonstraram que BiNPs levam a morte celular por apoptose em outros tipos celulares (HepG2 e NRK-52E), com alterações nos níveis de glutathione, malondialdeído e 8-hidroxideoxiguanosina, indicativo de dano oxidativo. Este mecanismo de morte celular é conhecido também para outros tipos de NPs, como NPs de paládio (ALARIFI et al., 2017), óxido de grafeno (DING et al., 2014), dióxido de titânio (WANG et al., 2014), carbono (YAN et al., 2017), prata (CHEN et al., 2016), dentre outros. Como mencionado anteriormente, o mecanismo “Efeito Cavalo de Tróia aumentado por lisossomos” gerado por NPs metálicas leva a uma toxicidade específica contra alguns alvos celulares, culminando em morte celular por apoptose (SABELLA et al., 2014) e corroborando os achados

deste presente trabalho.

Posteriormente, abordou-se a síntese, caracterização e interação de SiO₂NPs e células BALB/c 3T3. Neste caso, dois tipos de SiO₂NPs foram sintetizadas: SiO₂NPs com fluorescência (Rodamina) e SiO₂NPs sem fluorescência. Ambas as SiO₂NPs utilizadas neste trabalho possuem uma distribuição de tamanho homogêneo e diferentemente das BiNPs, não necessitam de corona para se manterem estáveis. Além disso, a produção das SiO₂NPs foi por meio de síntese química. Estas NPs já estão presentes em muitos produtos que são utilizados em nosso dia-a-dia e muito embora existam diversos estudos que suportem a sua segurança, é fato que devido à grande diversidade em tamanho e funcionalizações que estas NPs possuem, um melhor entendimento sobre cada tipo de SiO₂NPs e sua interação com sistemas biológicos ainda se faz ainda necessário (MEBERT et al., 2017). Uma vez que estas NPs já são encontradas em diversos produtos (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019) e atualmente estão sendo avaliadas para o emprego como adjuvantes em vacinas orais para hepatite B (RASMUSSEN et al., 2019), torna-se essencial que a toxicidade oral aguda, bem como outros mecanismos de toxicidade sejam entendidos com clareza, a fim de não serem gerados efeitos indesejados por conta do uso destas NPs.

A citotoxicidade de ambos os tipos de SiO₂NPs foi avaliada, bem como os valores de IC₂₀, IC₅₀, IC₈₀ e predição da DL₅₀ e a classe GHS. Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes valores para SiO₂NPs com e sem fluorescência. No caso de SiO₂NPs, são necessárias concentrações de NPs cerca de 80 vezes maiores que as BiNPs para que seja observada alteração na viabilidade celular relativa (concentrações maiores que 1 g/ml). Outros autores já demonstraram que SiO₂NPs possuem baixa toxicidade (HSIAO et al., 2014; IZAK-NAU et al., 2014; MANNERSTRÖM et al., 2016; UBOLDI et al., 2012). A toxicidade destas NPs já foi demonstrada anteriormente em células BALB/c 3T3, no entanto, nenhum destes trabalhos avaliou as concentrações de IC₅₀ ou mesmo a predição de DL₅₀ e classe GHS. Mannerström e colaboradores (2016) avaliaram a citotoxicidade de diversos tipos de NPs, incluindo SiO₂NPs em células BALB/c 3T3 e observaram que a toxicidade destas NPs foi baixa a ponto

de não ter sido possível calcular o IC₅₀ neste tipo celular. Uboldi e colaboradores (2011) também demonstraram a ausência de efeitos citotóxicos ou genotóxicos de SiO₂NPs em células BALB/c 3T3 em concentrações de até 100 µg/ml.

Ao predizer a classe de toxicidade de ambas as SiO₂NPs, elas se enquadraram na classe 4 de toxicidade, assim como as BiNPs. No entanto, é importante salientar que os valores de IC₂₀, IC₅₀, IC₈₀, bem como a DL₅₀ foram bastante distintos entre BiNPs e SiO₂NPs. Para SiO₂NPs, a DL₅₀ predita foi de 1779.71±78.58 mg/kg para SiO₂NPs sem fluorescência e 1737.87±64.81 mg/kg para SiO₂NPs com fluorescência. A classe 4 GHS compreende uma ampla faixa de toxicidade, incluindo drogas que vão de 300 até 2000 mg/kg. As BiNPs tiveram valores que se aproximaram do limite inferior da classe GHS (300 mg/kg), enquanto as SiO₂NPs apresentaram valores próximas ao limite superior da classe GHS (2000 mg/kg) e portanto, esses dados devem ser avaliados com cautela e encarados com valores para a estimativa da dose inicial para ensaio de toxicidade oral aguda (OECD no 423). Estudos *in vivo* acerca da toxicidade de alguns tipos de SiO₂NPs já foram realizados por alguns autores. Lee e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos após a administração oral de 500 e 1000 mg/kg de SiO₂NPs em ratos e observaram que muito embora estas NPs atingissem órgãos-alvo como rins, fígado, pulmões e baço, nenhuma toxicidade aguda foi observada nessas doses. Xie e colaboradores (2010) investigaram a distribuição tecidual os potenciais efeitos tóxicos de SiO₂NPs após a administração crônica (30 dias) das mesmas por via intravenosa; eles observaram uma concentração de SiO₂NPs nos pulmões, fígado e baço, além de observar uma injúria hepática causada devido a endocitose destas NPs por macrófagos. Ainda, Chan e colaboradores (2017) também avaliaram os efeitos tóxicos de SiO₂NPs *in vivo* em ratos ao administrar doses de até 300 mg/kg via intravenosa; todos os animais sobreviveram e comportaram-se de forma normal. Em 2011, Lin e colaboradores avaliaram os efeitos tóxicos de SiO₂NPs após administração em doses únicas ou repetidas via intravenosa em ratos e constataram a DL₅₀ foi maior que 1000 mg/kg, com acúmulo das NPs em órgãos como fígado e baço. Em um recente estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (2017), foram avaliados 11 tipos de nanomateriais, incluindo SiO₂NPs (13-20 nm), quanto a perigos para a saúde humana de acordo com os critérios

de classificação GHS. Os resultados demonstraram que SiO₂NPs possuem baixa toxicidade (sem categorização de perigo) em relação a toxicidade aguda, corrosão e irritação cutânea, irritação ou dano ocular, sensibilização respiratório ou cutânea, mutagenicidade e toxicidade reprodutiva; no entanto, apontou-se que em relação a toxicidade órgão-específica com exposições repetidas, estas NPs são classificadas como categoria 2 em relação a exposição com inalação, pois podem causar danos aos pulmões. Portanto, em relação a este quesito, estas NPs demonstraram fortes evidências de potencialmente prejudicar a saúde humana (LEE et al., 2017).

Um outro resultado obtido durante a realização deste trabalho foi a presença de um comportamento bastante peculiar que estas SiO₂NPs causavam nas células BALB/c 3T3, denominado hormese. A hormese consiste em um termo utilizado por toxicologistas, e define-se como uma dose resposta bifásica frente a um agente, onde em baixas concentrações há um estímulo ou efeito benéfico, enquanto em altas concentrações observa-se um efeito tóxico ou inibitório. Pode-se dizer que a hormese refere-se a uma resposta adaptativa das células frente a um estresse moderado (MATTSON, 2008). Este fenômeno já foi associado com outros tipos de NPs também (NASCARELLA & CALABRESE, 2012), incluindo SiO₂NPs. Mannerström e colaboradores (2016) avaliaram a predição de efeitos tóxicos de diversos tipos de NPs em células BALB/c 3T3, incluindo SiO₂NPs; os resultados demonstraram efeitos horméticos, com um aumento na viabilidade celular relativa e atividade mitocondrial quando as células foram expostas a 465 µg/mL de SiO₂NPs – exatamente a mesma concentração utilizada no presente trabalho. Em 2016, Mytych e colaboradores avaliaram a interação entre fibroblastos dérmicos humanos e nanodiamantes e SiO₂NPs e também observaram uma curva concentração-resposta bifásica através do ensaio do MTT, sugerindo efeitos horméticos. Apesar de ser muito difundida a toxicidade de substâncias sintéticas em altas doses, a exposição crônica a mistura químicas de baixa dosagem tem sido apenas recentemente correlacionada a diversas doenças relacionadas a idade (KIM et al., 2018). A adoção da avaliação de efeitos horméticos representa um avanço significativo no processo de avaliação de compostos químicos. O modelo hormético permite estimar os possíveis perigos à saúde pública, uma vez que tanto os efeitos

acima, quanto abaixo do *threshold* podem causar efeitos adversos. A adoção deste tipo de avaliação dentro do modelo de *risk assessment* é suportado por diversas evidências científicas (CALABRESE, 2015).

Ainda ao final do terceiro capítulo, abordamos alguns resultados não publicados em relação a SiO₂NPs. Estas NPs causam efeitos horméticos nas células BALB/c 3T3 nas condições testadas e padronizadas pelas agências regulatórias internacionais (OECD, 2010). Sendo assim, buscou-se entender se estes efeitos ainda estariam presentes com a redução de SBF nos cultivos, uma vez que a redução de SBF representa uma vantagem industrial muito grande, tanto pelo alto custo agregado (ZHENG et al., 2006), quanto pelas questões éticas envolvidas (ASTORI et al., 2016). Os resultados demonstraram que com a redução do SBF não foi possível observar mais o mesmo fenômeno. A utilização de uma droga controle (SDS) foi a chave para a descoberta que esta ausência de hormese em concentrações reduzidas de SBF se dá pelo fato de as células BALB/c 3T3 se tornarem fragilizadas nestas condições de cultivo. Kulkarni e McCulloch (1994) demonstraram que a simples privação de soro induz a morte celular apoptótica em células BALB/c 3T3. Além disso, Mannerström e colaboradores (2016) mencionam em seu trabalho que para BALB/c 3T3, a concentração de soro mínima para a sobrevivência da célula é de 5%. Estes estudos justificam e corroboram nossos achados, fenômeno portanto não relacionado às SiO₂NPs. Estes dados reforçam a importância da padronização de metodologias para avaliação de NPs levando em conta as limitações dos modelos empregados (MANNERSTRÖM et al., 2016).

A interação entre SiO₂NPs e células BALB/c 3T3 também foi demonstrada ao longo deste terceiro capítulo. Para tanto, diferentes concentrações de SiO₂NPs foram empregadas: a concentração de IC₅₀ (1986.36 µg/ml) e duas concentrações atóxicas (465.1 µg/ml and 1129.1 µg/ml). Muitas NPs foram encontradas tanto fora quanto dentro das células e não houve a presença de alterações ultraestruturais significativas na maior parte das células. Ubaldi e colaboradores (2011) utilizaram concentrações de SiO₂NPs até 100 µg/ml em células BALB/c 3T3 e observaram que estas NPs acumulam-se no citoplasma das células e nestas concentrações, não causam efeitos citotóxicos ou

genotóxicos nas células. Alguns outros autores também já demonstraram que o mecanismo responsável pela endocitose destas NPs em diferentes tipos celulares ocorre através de mecanismos mediados por clatrina e caveolina (HSIAO et al., 2014 HU et al., 2011). Semelhantemente ao observado com BiNPs, os resultados para SiO₂NPs demonstraram que essas NPs acumularam-se em estruturas semelhantes a vacúolos/lisossomos. Schütz e colaboradores (2016) avaliaram a interação entre SiO₂NPs e células HeLa e observaram que estas NPs acumulam-se nos lisossomos, resultando inclusive em uma inibição do *turnover* proteico mediado por autofagia e consequentemente impactando na fisiologia celular. Yanes e colaboradores (2013) demonstraram que SiO₂NPs são internalizadas por células A549 e inclusive exocitadas pelas mesmas células após a internalização; os mesmos autores ainda demonstraram que os lisossomos estão envolvidos neste processo, dado que a inibição lisossomal nestas células impactou diretamente na redução da exocitose das SiO₂NPs. Ainda, outros autores também demonstraram imagens de microscopia eletrônica de transmissão e acúmulo de SiO₂NPs em estruturas vesiculares muito similares as do presente estudo (DUAN et al., 2013; KIM et al., 2017; KRETOWSKI et al., 2017; PARK et al., 2016). Todos estes estudos corroboram nossos dados e indicam que SiO₂NPs são endocitadas e acumuladas em estruturas semelhantes a lisossomos, independente do tipo celular. Informações acerca de processos de internalização e externalização de NPs por células são de extrema importância em um vasto campo de conhecimento: desde a avaliação da nanotoxicologia a viabilidade da aplicação de NPs em funções como de *drug delivery* (YANES et al., 2013; REES et al., 2019).

Muito embora a maior parte das células não apresentassem alterações ultraestruturais, algumas poucas foram identificadas com danos consideráveis quando expostas a concentração de IC₅₀. Diferentemente das alterações celulares observadas nas células expostas a BiNPs (figuras de mielina), no caso das SiO₂NPs outras alterações foram demonstradas, como: ruptura da membrana plasmática, desaparecimento de organelas e dano ao sistema de endomembranas; características comuns ao processo de necrose celular (MAHTO et al., 2011). Sendo assim, o mecanismo de morte por necrose foi investigado. Diferentemente do que havia sido observado para BiNPs (morte por

apoptose), no caso das SiO₂NPs, o principal mecanismo de morte celular gerado após a exposição a altas concentrações é a necrose. Os resultados obtidos em trabalhos anteriores demonstram resultados e conclusões distintos dependendo do tipo celular avaliado. Kretowski e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de SiO₂NPs em células LBC3 e LN-18; enquanto para células LBC3 eles demonstraram que tanto o processo de necrose, quanto apoptose estava envolvido, para células LN-18, apenas o mecanismo de necrose foi detectado. Outros autores já demonstraram que para células HepG2, SiO₂NPs levam a apoptose celular através de uma via mitocondrial causada por estresse oxidativo (AHMAD et al., 2012; LIU et al., 2011). Já em 2013, Duan e colaboradores demonstraram que em células HUVECs, as SiO₂NPs levam a mecanismos de necrose e apoptose celular, porém majoritariamente de necrose. Em suma, estes resultados demonstram que uma heterogeneidade no mecanismo de morte celular dependendo do tipo celular avaliado. Em 2015, Kim e colaboradores avaliaram a influência de SiO₂NPs de diferentes tamanhos em 3 tipos celulares distintos (células A549, HepG2 e NIH/3T3) e observaram que os efeitos causados pelas SiO₂NPs não eram apenas tamanho e concentração-dependentes mas também eram altamente diferentes dependendo do tipo celular avaliado.

Muito embora seja extremamente importante avaliar os mecanismos de morte celular causados por NPs, é fato que os efeitos citotóxicos são altamente dependentes de propriedades físico-químicas, como dispersão, tamanho, formato e carga das NPs. Ainda, dependendo do tipo de NP, diferentes mecanismos de morte celular podem ocorrer, de forma dose, tamanho e formato-dependente. Estas peculiaridades apenas reforçam o quanto mais pesquisas e sistemas otimizados precisam ser definidos para estes tipos de compostos, especialmente quando estes são considerados para utilização com fins terapêuticos (LEE et al., 2017; MOHAMMADINEJAD et al., 2018).

Como qualquer tipo de material que destina-se à utilização na indústria, a produção, caracterização e estabilidade de NPs também deve ser padronizada, levando conseqüentemente a geração de materiais que mantenham suas características homogêneas ao longo das produções. O presente trabalho iniciou

com 4 diferentes tipos de NPs: NPs de ferro (FeNPs), NPs de ouro (AuNPs), NPs de bismuto (BiNPs) e NPs de sílica (SiO₂NPs). No entanto, o prosseguimento do trabalho se deu apenas com as BiNPs e SiO₂NPs.

Outras questões de grande importância que devem ser levadas em consideração quando se refere à produção e aplicação de NPs é a reprodutibilidade e os métodos de caracterização das mesmas (ALIBART et al., 2010; LAURA et al., 2018; MAHMOODI et al., 2013; MINELLI et al., 2019; MIRELES et al., 2016) ou mesmo as diferenças de resultados obtidos entre laboratórios (HOLE et al., 2013). A falta de reprodutibilidade na fabricação de NPs gera uma situação alarmante tanto para a comunidade científica, quanto para as indústrias que as desenvolvem e produzem para fins biomédicos (Mireles et al., 2016), o que pode justificar o fato de haver um número significativamente maior de publicações avaliando NPs do que de produtos aprovados para o uso em medicina (VENDITTO & SZOKA JR, 2013).

A aplicação de NPs em produtos tem crescido, desde a área cosmética a produtos processados, e portanto, a exposição humana a NPs tem se tornado mais frequente de forma diretamente proporcional. Sendo assim, pesquisas que busquem entender os potenciais riscos envolvidos devido a exposição a NPs devem ser conduzidas (FOROOZANDEH & AZIZ, 2018). Os resultados obtidos ao longo deste trabalho ajudam a reforçar a importância de se avaliar a citotoxicidade de NPs. Estas partículas podem ser internalizadas e podem levar a morte celular ou mesmo aumento da viabilidade celular relativa, o que pode causar efeitos secundários quando estas NPs são aplicadas principalmente na área biomédica. Através dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível observar que as concentrações que levam a toxicidade celular são bastante distintas, assim como os mecanismos de morte e danos celulares. Portanto, estudar estas NPs de forma única e individualizada se faz de extrema importância. A viabilidade comercial de produtos com nanotecnologia no futuro dependerá diretamente de avaliações de toxicidade realizadas de forma cautelosa hoje (KUMAR, DASGUPTA & RANJAN, 2018). Os métodos utilizados para a avaliação de macropartículas e materiais em escala *bulk* tem sido aplicados para a avaliação de compostos nanoparticulados. Ainda existem

algumas limitações destes métodos que devem ser atualizados no contexto de nanomateriais. Além disso, as *guidelines* que regulam a avaliação de toxicidade de nanomateriais precisam ser reavaliadas considerando as propriedades únicas das NPs (KUMAR, DASGUPTA & RANJAN, 2018). Portanto, mais estudos acerca de mecanismos de ação e de toxicidade de NPs, bem como a padronização de metodologias que levem em conta as peculiaridades das NPs para o *risk assessment* devem ainda ser realizados a fim de elucidar de forma mais clara como e por que estes fenômenos ocorrem.

9 CONCLUSÕES

Através do presente trabalho, foi possível concluir que NPs de ferro (FeNPs), ouro (AuNPs), bismuto (BiNPs) e sílica (SiO₂NPs) possuem características, propriedades e comportamentos distintos, tanto em relação a tamanho, morfologia e estabilidade, quanto em relação a interação celular e toxicidade (no caso de BiNPs e SiO₂NPs).

FeNPs produzidas por síntese química possuem morfologia distinta mesmo se forem adicionadas apenas pequenas alterações no processo de síntese. As FeNPs utilizadas no presente trabalho não tiveram uma reprodutibilidade ao longo das produções lote a lote e por essa razão foram descontinuadas do trabalho.

AuNPs produzidas por ablação a laser são homogêneas em tamanho. Demonstramos através de resultados prévios as concentrações que levam a alterações na viabilidade celular relativa, bem como a classe de toxicidade GHS (classe 4). No entanto, devido a falta de estabilidade destas NPs nas produções subsequentes, as AuNPs foram descontinuadas do trabalho.

BiNPs produzidas por ablação a laser são redondas e heterogêneas em tamanho. As mesmas necessitam da formação de corona NP-proteína para se tornarem estáveis. Neste trabalho, esta corona foi formada através da adição de proteínas do SBF e BSA. Demonstramos através dos resultados as concentrações que levam a morte e dano celular. Observamos que em determinar concentrações, BiNPs possuem efeitos citotóxicos insignificantes, porém, quando alcançam determinadas concentrações são internalizadas pelas células e levam a morte celular por apoptose de forma dose-dependente. Estas NPs se acumulam em estruturas semelhantes a lisossomos e levam a formação de figuras de mielina, indicadoras de autofagia celular. Quando predita a classe de toxicidade GHS destas NPs, elas foram classificadas como pertencentes a classe 4 de toxicidade.

As SiO₂NPs utilizadas neste trabalho possuem uma distribuição de tamanho homogêneo e não necessitam de corona para se manterem estáveis.

Quanto a toxicidade, SiO₂NPs com fluorescência (Rodamina) e sem fluorescência são semelhantes. Para ser detectada alteração na viabilidade celular relativa, necessita-se de concentrações de SiO₂NPs muito maiores do que de BiNPs (cerca de 80 vezes). Porém, quando em altas concentrações, estas NPs levam a morte celular por necrose. Além disso, estas NPs se acumulam em estruturas semelhantes a lisossomos. Entretanto, diferentemente de BiNPs, a internalização destas NPs não leva a alterações a nível ultraestrutural. Estas NPs também causam efeitos horméticos nas células: em altas concentrações, estas NPs levam a morte celular, enquanto em uma determinada janela de baixas concentrações, estas NPs levam a um aumento na viabilidade celular relativa, sugerindo que nestas concentrações ocorra um estímulo à proliferação celular. Além disso, muito embora as concentrações de SiO₂NPs que levam a morte celular sejam significativamente maiores que as de BiNPs, ao predizer a classe de toxicidade das SiO₂NPs, elas também se enquadram na classe 4 de toxicidade GHS.

Os resultados obtidos até o presente momento demonstram a importância de se avaliar a citotoxicidade de NPs. Estas partículas apresentam comportamento distintos e podem ser internalizadas, levar a fenômenos de morte ou proliferação celular. Estes pontos são cruciais para a avaliação previamente a aplicação na área biomédica, uma vez que estes fenômenos podem levar a efeitos indesejados e adversos, principalmente quando se trata de materiais destinados ao uso na medicina. Mais estudos acerca de mecanismos de ação e de toxicidade devem ainda ser realizados a fim de elucidar de forma mais clara como e por que estes fenômenos ocorrem.

10 PERSPECTIVAS

Como perspectivas do presente trabalho, temos:

- Aperfeiçoar o processo de síntese para garantir NPs mais reprodutíveis e com características mais homogêneas;
- Avaliação dos efeitos citotóxicos de NPs em outros modelos celulares, como células-tronco adultas;
- Avaliação dos efeitos de NPs em modelos de adipogênese e osteogênese utilizando células-tronco adultas;
- Avaliação da atividade antimicrobiana de NPs;
- Avaliação a interação de NPs com o sistema imunológico;
- Avaliação de NPs em outros modelos de avaliação de citotoxicidade e validação destes métodos.

11 REFERÊNCIAS

- ABUD, A. P.; ZYCH, J.; REUS, T.L.; KULIGOVSKI, C.; DE MORAES, E.; DALLAGIOVANNA, B.; DE AGUIAR, A.M. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 73, n. 3, p. 992-8, 2015.
- ABUDAYYAK, M.; OZTAS, E.; ARICI, M.; OZHAN, G. Investigation of the toxicity of bismuth oxide nanoparticles in various cell lines. *Chemosphere*, v. 169, p. 117-123, 2017.
- ADJEI, I. M.; SHARMA, B.; LABHASETWAR, V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol*, v. 811, p. 73-91, 2014.
- AHMAD, J.; AHAMED, M.; AKHTAR, M.J.; ALROKAYAN, S.A.; SIDDIQUI, M.A.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A.A. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 259, p. 160-168, 2012.
- ALARIFI, S.; ALI, D.; ALKAHTANI, S.; ALMEER, R.S. ROS-Mediated Apoptosis and Genotoxicity Induced by Palladium Nanoparticles in Human Skin Malignant Melanoma Cells, *Oxid Med Cell Longev*, v. 2017, 2017.
- ALBANESE, A.; TANG, P.S.; CHAN, W.C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng*, v. 14, p. 1-16, 2012.
- ALDEWACHI, H.; CHALATI, T.; WOODROOFE, M.N.; BRICKLEBANK, N.; SHARRACK, B.; GARDINER, P. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. *Nanoscale*, v. 10, n.1., p. 18-33, 2017.
- ALIBART, F.; PLEUTIN, S.; GUÉRIN, D.; NOVEMBRE, C.; LENFANT, S.; LMIMOUNI, K.; GAMRAT, C.; VUILLAUME, D. An Organic Nanoparticle Transistor Behaving as a Biological Spiking Synapse. *Adv Funct Mater*, v. 20, p. 330-337, 2010.
- ALKILANY, A. M.; MURPHY, C. J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res*, v. 12, n. 7, p. 2313-2333, 2010.
- ANDRÉ, E. M.; PASSIRANI, C.; SEIJO, B.; SANCHEZ, A.; MONTERO-MENEI, C.N. Nano and microcarriers to improve stem cell behaviour for neuroregenerative medicine strategies: Application to Huntington's disease. *Biomaterials*, v. 83, p. 347-62, 2016.
- ASTORI, G.; AMATI, E.; BAMBI, F.; BERNARDI, M.; CHIEREGATO, K.; SCHÄFER, R.; SELLA, D.; RODEGHIRO, F. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. *Stem Cell Res Ther*, v. 7, n.93, 2016.
- AZHDARZADEH, M.; SAEI, A.A.; SHARIFI, S.; HAJIPOUR, M.J.; ALKILANY, A.M.; SHARIFZADEH, M.; RAMAZANI, F.; LAURENT, S.; MASHAGHI, A.; MAHMOUDI, M. Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology.

Nanomed, v. 10, n. 18, p. 2931-2952, 2015.

BARBERO, F.; VITALI, M.; PIELLA, J.; SALVO, I.; BORRAJO, M.L.; BUSQUETS-FITÉ, M.; GRANDORI, R.; BASTÚS, N.G.; CASALS, E.; PUNTES, V. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System. *Semin Immunol*, v.34, p. 52-60, 2017.

BEZERRA JR, A.G.; MACHADO, T.N.; WOISKI, T.D.; TURCHETTI, D.A.; LENZ, J.A.; AKCELRUD, L.; SCHREINER, W.H. Plasmonics and SERS activity of post-transition metal Nanoparticles. *J Nanopart Res*, v. 20, n.142, 2018.

BITAR, A.; AHMAD, N.M.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug Discov Today*, v.17, n. 19/20, p. 1147-1154, 2012.

BROEDERS, J. J.; BLAAUBOER, B. J.; HERMENS, J. L. In vitro biokinetics of chlorpromazine and the influence of different dose metrics on effect concentrations for cytotoxicity in Balb/c 3T3, Caco-2 and HepaRG cell cultures. *Toxicol In Vitro*, v. 27, n. 3, p. 1057-64, 2013.

BURNS, A.; SENGUPTA, P.; ZEDAYKO, T.; BAIRD, B.; WIESNER, U. Core/Shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: towards single-particle laboratories. *Small*, v. 2, n.6, p. 723-726, 2016.

CALABRESE, E.J. Hormesis: principles and applications. *Homeopathy*, v. 104, n.2, p. 69-82, 2015.

CARNEIRO, C.E.A.; IVASHITA, F.F.; DE SOUZA JUNIOR, I.G.; SOUZA, C.M.D.; PAESANO, A.; COSTA, A.C.S.; DI MAURO, E.; DE SANTANA, H.; ZAIA, C.T.B.V.; ZAIA, D.A.M. Synthesis of goethite in solutions of artificial seawater and amino acids: a prebiotic chemistry study. *International Journal of Astrobiology*, v. 12, p.149-160, 2013.

CARNEIRO, M.F.H; BARBOSA JR, F. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, v. 19, p. 129-148, 2016.

CHAN, W. T.; LIU, C.C.; CHIANG CHIAU, J.S.; TSAI, S.T.; LIANG, C.K.; CHENG, M.L.; LEE, H.C.; YEUNG, C.Y.; HOU, S.Y. In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. *Int J Nanomedicine*, v. 12, p. 3421-3432, 2017.

CHEN, N.; SONG, Z.M.; TANG, H.; XI, W.S.; CAO, A.; LIU, Y.; WANG, H. Toxicological Effects of Caco-2 Cells Following Short-Term and Long-Term Exposure to Ag Nanoparticles. *Int J Mol Sci*, v. 17, n. 6, 2016.

CHOI, S. J.; OH, J. M.; CHOY, J. H. Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg Biochem*, v. 103, n. 3, p. 463-71, 2009.

CHOU, L.Y.T; MING, K.; CHAN, W.C.W. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles, *Chem Soc Rev*, v. 40, p. 233-245, 2011.

CLAUDIO, C-R.; CHELLAM, S. Bismuth nanoparticles: antimicrobials of broad-spectrum, low cost and safety. *Nanomed*, v. 17, p. 430-438, 2014.

COECKE, S.; BALLS, M.; BOWE, G.; DAVIS, J.; GSTRAUNTHALER, G.;

HARTUNG, T.; HAY, R.; MERTEN, O.W.; PRICE, A.; SCHECHTMAN, L.; STACEY, G.; STOKES, W. Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern Lab Anim*, v. 33, n. 3, p. 261-87, 2005.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. The iron oxides: structures, properties, reactions, occurrences and uses. Wiley-VCH: Weinheim, 2006.

DASARI, T. P. S.; ZHANG, Y.; YU, H. Antibacterial activity and cytotoxicity of gold (I) and (III) ions and gold nanoparticles. *Biochem Pharmacol*, v. 4, n.6, 2015.

DE OLIVEIRA, L. F.; BOUCHMELLA, K.; GONÇALVES, K.A.; BETTINI, J.; KOBARG, J.; CARDOSO, M.B. Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. *Langmuir*, v. 32, n. 13, p. 3217-25, 2016.

DE SOUZA E SILVA, J. M.; HANCHUK, T.D.M.; SANTOS, M.I.; KOBARG, J.; BAJGELMAN, M.C.; CARDOSO, MB. Viral Inhibition Mechanism Mediated by Surface-Modified Silica Nanoparticles. *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 8, n. 26, p. 16564-72, 2016.

DINALI, R.; EBRAHIMINEZHAD, A.; MANLEY-HARRIS, M.; GHASEMI, Y.; BERENJIAN, A. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology. *Crit Rev Microbiol*, v. 43, n.4, p. 493-507, 2017.

DING, Z.; ZHANG, Z.; MA, H.; CHEN, Y. In vitro hemocompatibility and toxic mechanism of graphene oxide on human peripheral blood T lymphocytes and serum albumin. *ACS Appl Mater Interfaces*, v. 6, n. 22, p. 19797-807, 2014.

DUAN, J.; YU, Y.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y.; ZHOU, X.; HUANG, P.; SUN, Z. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA damage response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PLoS One*, v. 8, p. 1-13, 2013.

ECCVAM. Acute toxicity, 2018. Disponível em: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/validation-regulatory-acceptance/systemic-toxicity/acute-toxicity>

EL-BATAL, A. I.; EL-SAYYAD, G.S.; EL-GHAMRY, A.; AGAYPI, K.M.; ELSAYED, M.A.; GOBARA, M. Melanin-gamma rays assistants for bismuth oxide nanoparticles synthesis at room temperature for enhancing antimicrobial, and photocatalytic activity. *J Photochem Photobiol B*, v. 173, p. 120-139, 2017.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 64, n. 2, p. 129-37, 2012.

ERHIRHIE, E.O.; IHEKWEREME, C.P.; IODIGWE, E.E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdiscip Toxicol*, v.11, n.1, p. 5-12, 2018.

FAN, J.-H.; LI, W.-T.; HUNG, W.-I.; YEH, J.-M. Cytotoxicity and Differentiation Effects of Gold Nanoparticles To Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Eng. Appl Basis Commun*, v. 23, n. 2, p. 141–152, 2011.

FARD, J.K.; JAFARI, S.; EGHBAL, M.A. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, v. 5, p. 447-454, 2015.

FAVI, P.M.; GAO, M.; JOHANA, S.A.L.; OSPINA, S.P.; MORALES, M.; PAVON,

J.J.; WEBSTER, T.J. Shape and surface effects on the cytotoxicity of nanoparticles: Gold nanospheres versus gold nanostars. *J Biomed Mater Res A*, v.103, n.11, p.3449-3462, 2015.

FENECH, M.; MORLEY, A. A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res*, v. 161, n. 2, p. 193-8, 1986.

FORD, K.A. Refinement, Reduction, and Replacement of Animal Toxicity Tests by Computational Methods. *ILAR J*, v. 57, n. 2, p. 226-233, 2016.

FOROOZANDEH, P.; AZIZ, A.A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles, v. 13, n.1, 2018.

GOMES, M.C; CUNHA, A.; TRINDADE, T.; TOMÉ, J.P.C. The Role of Surface Functionalization of Silica Nanoparticles for Bioimaging, *J Innov Opt Health Sci*, v.9, n.4, p. 1-16, 2016.

GUARNIERI, D.; SABELLA, S.; MUSCETTI, O.; BELLI, V.; MALVINDI, M.A.; FUSCO, S.; DE LUCA, E.; POMPA, P.P.; NETTI, P.A. Transport across the cell-membrane dictates nanoparticle fate and toxicity: a new paradigm in nanotoxicology. *Nanoscale*, v. 6, n.17, p. 10264-10273, 2014.

GUO, L. W.; WU, Q.; GREEN, B.; NOLEN, G.; SHI, L.; LOSURDO, J.; DENG, H.; BAUER, S.; FANG, J.L.; NING, B. Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 262, n. 2, p. 117-23, 2012.

HANOT, C. C.; CHOI, Y.S.; ANANI, T.B.; SOUNDARRAJAN, D.; DAVID, A.E. Effects of Iron-Oxide Nanoparticle Surface Chemistry on Uptake Kinetics and Cytotoxicity in CHO-K1 Cells. *Int J Mol Sci*, v. 17, n. 1, 2015.

HASHAD, R. A.; ISHAK, R.A.; GENEIDI, A.S.; MANSOUR, S. Surface functionalization of methotrexate-loaded chitosan nanoparticles with hyaluronic acid/human serum albumin: Comparative characterization and in vitro cytotoxicity. *Int J Pharm*, v. 522, n. 1-2, p. 128-136, 2017.

HASHIMOTO, M.; YAMAGUCHI, S.; SASAKI, J.; KAWAI, K.; KAWAKAMI, H.; IWASAKI, Y.; IMAZATO, S. Inhibition of matrix metalloproteinases and toxicity of gold and platinum nanoparticles in L929 fibroblast cells. *Eur J Oral Sci*, v. 124, n. 1, p. 68-74, 2016.

HERNANDEZ-DELGADILLO, R.; DEL ANGEL-MOSQUEDA, C.; SOLÍS-SOLO, J.M.; MUNGUÍA-MORENO, S.; PINEDA-AGUILAR, N.; SANCHÉZ-NÁJERA, R.I.; CHELLAM, S.; CABRAL-ROMERO, C. Antimicrobial and antibiofilm activities of MTA supplemented with bismuth lipophilic nanoparticles. *Dent Mater J*, 2017.

HERNANDEZ-DELGADILLO, R.; VELASCO-ARIAS, D.; MARTINEZ-SANMIGUEL, J.J.; DIAZ, D.; ZUMETA-DUBE, I.; AVERALO-NIÑO, K.; CABRAL-ROMERO, C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Nanomedicine*, v. 8, p. 1645-52, 2013.

HOLE, P.; SILENCE, K.; HANNELL, C.; MAGUIRE, C.M.; ROESSLEIN, M.; SUAREZ, G.; CAPRACOTTA, S.; MAGDOLENOVA, Z.; HOREV-AZARIA, L.;

DYBOWSKA, A.; COOKE, K.; HAASE, A.; CONTAL, S.; MANO, S.; SNTJE, V.; SAUVAIN, J.-J.; STAUNTON, K.C.; ANGUSSOLA, S.; LUCH, A.; DUSINSKA, M.; KORENSTEIN, R.; GUTLEB, A.C.; WIEMANN, M.; PRINA-MELLO, A.; RIEDJKE, M.; WICK, P. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). *J Nanopart Res*, v. 15, n.12, 2013.

HROUZEK, P.; KAPUSCIK, A.; VACEK, J.; VORACOVA, K.; PAICHLOVÁ, J.; KOSINA, P.; VOLOSHKO, L.; VENTURA, S.; KOPECKY, J. Cytotoxicity evaluation of large cyanobacterial strain set using selected human and murine in vitro cell models. *Ecotoxicol Environ Saf*, v. 124, p. 177-185, 2016.

HSIAO, I.-L.; GRAMATKE, A.M.; JOKSIMOVIC, R.; SOKOLOWSKI, M.; GRADZIELSKI, M.; HAASE, A. Size and Cell Type Dependent Uptake of Silica Nanoparticles. *J Nanomed Nanotechnol*, v. 5, 2014.

HU, L.; MAO, Z.; ZHANG, Y.; GAO, C. Influences of size of silica particles on the cellular endocytosis, exocytosis and cell activity of HepG2 cells. *J Nanosc Let*, v.1, 2011.

HUBER, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. *Small*, v. 1, n. 5, p. 482-501, 2005.

ICCVAM. Background Review Document: in Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, 2006a. Disponível em: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/acutetox_docs/brd_tmter/brdvol1_nov2006.pdf.

ICCVAM. Background Review Document: in Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, 2006b. Disponível em: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/acutetox_docs/brd_tmter/brdvol2_nov2006.pdf.

ICCVAM. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity, 2001. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf

ICCVAM. Recommended Test Method Protocol: BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method, 2006c. Disponível em: http://iccvm.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm.

ICCVAM. Recommended Test Method Protocol: Normal Human Keratinocyte NRU Cytotoxicity Test Method, 2006d. Disponível em: http://iccvm.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmter.htm.

ICCVAM. Test Method Evaluation Report (TMER): in Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing, 2006e. Disponível em: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/acutetox_docs/brd_tmter/at-tmter-complete.pdf.

IRANI, S.; SHAHMIRANI, Z.; ATYABI, S.M.; MIRPOOR, S. Induction of growth arrest in colorectal cancer cells by cold plasma and gold nanoparticles. *Arch Med Sci*, v. 11, n. 6, p. 1286-95, 2015.

ISWARYA, V.; MANIVANNAN, J.; DE, A.; PAUL, S.; ROY, R.; JOHNSON, J.B.; KUNDU, R.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Surface capping and size-dependent toxicity of gold nanoparticles on different trophic levels. *Environ Sci Pollut Res Int*, v. 23, n. 5, p. 4844-58, 2016.

IZAK-NAU, E.; VOETZ, M.; EIDEN, S.; DUSCHL, A.; PUNTES, V.F. Altered characteristics of silica nanoparticles in bovine and human serum: the importance of nanomaterial characterization prior to its toxicological evaluation. *Part Fibre Toxicol*, v.10, n. 56, p. 1-12, 2013.

JAIN, A.; RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; RAMALINGAM, C. Nanomaterials in Food and Agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues. *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 58, n.2, p. 297-317, 2018.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ*, v. 400, n. 1-3, p. 396-414, 2008.

KANG, S.; BHANG, S.H.; HWANG, S.; YOON, J.K.; SONG, J.; JANG, H.K.; KIM, S.; KIM, B.S. Mesenchymal Stem Cells Aggregate and Deliver Gold Nanoparticles to Tumors for Photothermal Therapy. *ACS Nano*, v. 9, n. 10, p. 9678-90, 2015.

KASTEN, A.; GRUTTNER, C.; KUHN, J.P.; BADER, R.; PASOLD, J.; FRERICH, B. Comparative in vitro study on magnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking of adipose tissue-derived progenitor cells. *PLoS One*, v. 9, n. 9, p. e108055, 2014.

KIM, I. Y.; JOACHIM, E.; CHOI, H.; KIM, K. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine*, v. 11, n. 6, p. 1407-16, 2015.

KIM, J.-Y.; PARK, J.-H.; KIM, A.; JEONG, H.; HONG, J.; CHUCK, R.S.; PARK, C.Y. Safety of Nonporous Silica Nanoparticles in Human Corneal Endothelial Cells. *Sci Rep*, v. 7, 2017.

KIM, K. J.; JOE, Y.A.; KIM, M.K.; LEE, S.J.; RYU, Y.H.; CHO, D.W.; RHIE, J.W. Silica nanoparticles increase human adipose tissue-derived stem cell proliferation through ERK1/2 activation. *Int J Nanomedicine*, v. 10, p. 2261-72, 2015.

KIM, S.A.; LEE, Y.M.; CHOI, J.Y.; JACOBS JR, D.R.; LEE, D.H. Evolutionarily adapted hormesis-inducing stressors can be a practical solution to mitigate harmful effects of chronic exposure to low dose chemical mixtures. *Environ Pollut*, v. 233, p. 725-734, 2018.

KINNEAR, C.; MOORE, T.L.; RODRIGUEZ-LORENZO, L.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; PETRI-FINK, A. Form Follows Function: Nanoparticle Shape and Its Implications for Nanomedicine. *Chem Rev*, v.117, n.17, p. 11476-11521, 2017.

KOHL, Y.; GORJUP, E.; KATSEN-GLOBA, A.; et al. Effect of gold nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Nanopart Res*, v. 13, n. 12, p. 6789-6803, 2011.

- KONONENKO, V.; NARAT, M.; DROBNE, D. Nanoparticle interaction with the immune system. *Arh Hig Rada Toksikol*, v.66, n.2, p. 97-108, 2015.
- KRETOWSKI, R.; KUSACZUK, M.; NAUMOWICZ, M.; KOTYNSKA, J.; SZYNAKA, B.; CECHOWSKA-PASKO, M. The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines. *Nanomat*, v. 7, n.230, 2017.
- KULKARNI, G.V. & MCCULLOCH, C.A.G. Serum deprivation induces apoptotic cell death in a subset of Balb/c 3T3 fibroblasts, v. 107, p. 1169-1179, 1994.
- KUMAR, V.; DASGUPTA, N.; RANJAN, S. *Nanotoxicology: Toxicity Evaluation, Risk Assessment and Management*. 1 edição, 2018.
- KYRYLKOVA, K.; KYRYACHENKO, S.; LEID, M.; KIOUSSI, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, v. 887, p. 41-7, 2012.
- LAURA, U.; ARRUEBO, M.; SEBASTIAN, V. Towards the continuous production of Pt-based heterogeneous catalysts using microfluidic systems. *Dalton Trans*, v. 47, n.5, p. 1693-1702, 2018.
- LE BLOND, J.S.; BAXTER, P.J.; BELLO, D.; RAFTIS, J.; MOLLA, Y.B.; CUADROS, J.; DAVEY, G. Haemolytic activity of soil from areas of varying podoconiosis endemicity in Ethiopia. *PLoS One*, v. 12, n. 5, 2017.
- LEE, J.; KIM, M.K.; PAEK, H.J.; KIM, Y.R.; KIM, M.K.; LEE, J.K.; JEONG, J.; CHOI, S.J. Tissue distribution and excretion kinetics of orally administered silica nanoparticles in rats. *Int J Nanomedicine*, v. 9, p. 251-260, 2014.
- LEE, N.; LIM, C.H.; KIM, T.; SON, E.K.; CHUNG, G.S.; RHO, C.J.; LEE, S.R., YU, J. WHO GUIDELINES ON PROTECTING WORKERS FROM Which hazard category should specific nanomaterials or groups of nanomaterials be assigned to and how ? World Health Organization, 2017.
- LEE, Y.K.; CHOI, E.J.; WEBSTER, T.J.; KIM, S.H.; KHANG, D. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *Int J Nanomedicine*, v. 10, p. 97-113, 2014.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small Journal*, v. 4, p. 26 - 49, 2008.
- LI, F.; LU, J.; KONG, X.; HYEON, T.; LING, D. Dynamic Nanoparticle Assemblies for Biomedical Applications. *Adv Mat*, v. 29, 2017.
- LI, X.; WEI, J.; AJFANTIS, K.E.; FAN, Y.; FENG, Q.; CUI, F.Z.; WATARI, F. Current investigations into magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A*, v.104, n.5, p. 1285-1296, 2016.
- LI, Y.; JU, D. The Role of Autophagy in Nanoparticles-Induced Toxicity and Its Related Cellular and Molecular Mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, v.1048, p.71-84, 2018.
- LI, Z.; HU, Y.; HOWARD, K.A.; JIANG, T.; FAN, X.; MIAO, Z.; SUN, Y.; BESENBACHER, F.; YU, M. Multifunctional Bismuth Selenide Nanocomposites for Antitumor Thermo-Chemotherapy and Imaging. *ACS Nano*, v. 10, n. 1, p. 984-997, 2016.
- LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and

Comet assay. *Chemosphere*, v. 93, n. 2, p. 269-73, 2013.

LIN, W.; HUANG, Y.W.; ZHOU, X.D.; MA, Y. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 217, n. 3, p. 252-9, 2006.

LIU, J.; ZHENG, X.; YAN, L.; ZHOU, L.; TIAN, G.; YIN, W.; WANG, L.; HU, Z.; GU, Z.; CHEN, C.; ZHAO, Y. Bismuth sulfide nanorods as a precision nanomedicine for in vivo multimodal imaging-guided photothermal therapy of tumor. *ACS Nano*, v. 9, n. 1, p. 696-707, 2015.

LIU, T.; LI, L.; TENG, X.; HUANG, X.; LIU, H.; CHEN, D.; REN, J.; HE, J.; TANG, F. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials*, v. 32, p. 1657-1668, 2011.

LIU, Y.; ZHUANG, J.; ZHANG, X.; YUE, C.; ZHU, N.; YANG, L.; WANG, Y.; CHEN, T.; WANG, Y.; ZHANG, L.W. Autophagy associated cytotoxicity and cellular uptake mechanisms of bismuth nanoparticles in human kidney cells. *Toxicol Lett*, v. 275, p. 39-48, 2017.

LOPEZ-CHAVES, C.; SOTO-ALVAREDO, J.; MINTES-BAYON, M.; BETTMER, J.; LLOPIS, J.; SANCHEZ-GONZALEZ, C. Gold nanoparticles: Distribution, bioaccumulation and toxicity. In vitro and in vivo studies. *Nanomedicine*, v. 14, n. 1. p. 1-12, 2018.

LU, X.; QIAN, J.; ZHOU, H.; GAN, Q.; TANG, W.; LU, J.; YUAN, Y.; LIU, C. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells. *Int J Nanomedicine*, v. 6, p. 1889-1901, 2011.

LUNDQVIST, M.; STIGLER, J.; ELIA, G.; LYNCH, I.; CEDERVALL, T.; DAWSON, K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 38, p. 14265-70, 2008.

LUNDQVIST, M. Nanoparticles: Tracking protein corona over time. *Nat Nanotechnol*, v. 8, n. 10, p. 701-2, 2013.

LUO, Y.; WANG, C.; QIAO, Y.; HOSSAIN, M.; MA, L.; SU, M. In vitro cytotoxicity of surface modified bismuth nanoparticles. *J Mater Sci Mater Med*, v. 23, n. 10, p. 2563-73, 2012.

MAHMOODI, S.R; BAYATI, M.; HOSSEINIRAD, S.; FOROUMADI, A.; GILANI, K.; REZAYAT, S.M. AC electrokinetic manipulation of selenium nanoparticles for potential nanosensor applications. *Mater Res Bull*, v.48, p.1262-1267, 2013.

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A.S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*, v. 336, n. 2, p. 510-8, 2009.

MAHTO, S.K.; VINOD, T.P.; KIM, J.; RHEE, S.W. Cytotoxic Potentials of Tellurium Nanowires in BALB/3T3 Fibroblast Cells. *Bukk Korean Chem Soc*, v. 32, n.9, 2011.

MALDONADO-CAMARGO, L.; UNNI, M.; RINALDI, C. Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Methods Mol Biol*, v. 1570, p. 47-71, 2017.

MANNERSTRÖM, M.; ZOU, J.; TOIMELA, T.; PYYKKO, I.; HEINONEN, T. The applicability of conventional cytotoxicity assays to predict safety/toxicity of mesoporous silica nanoparticles, silver and gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes. *Toxicol In Vitro*, v. 37, p. 113-120, 2016.

MATEO, D.; MORALES, P.; ÁVALOS, A.; HAZA, A.I. Oxidative stress contributes to gold nanoparticle-induced cytotoxicity in human tumor cells. *Toxicol Mech Methods*, v.24, n.3, p.161-172, 2014.

MATTSON, M.P. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev*, v. 7. n.1, p. 1-7, 2008.

MEBERT, A.M.; BAGLOLE, C.J.; DESIMONE, M.F.; MAYSINGER, D. Nanoengineered silica: Properties, applications and toxicity. *Food Chem Toxicol*, v. 109, p. 752-770, 2017.

MINELLI, C.; BARTCZAK, D.; PETERS, R.; RISSLER, J.; UNDAS, A.; SIKORA, A.; SJOSTROM, E.; GOENAGA-INFANTE, H.; SHARD, A.G. Sticky Measurement Problem: Number Concentration of Agglomerated Nanoparticles. *Langmur*, v. 35, p. 4927-4935, 2019.

MIRELES, L.K.; SACER, E.; YAHIA, L.; LAURENT, S.; STANICKI, D. A comparative physicochemical, morphological and magnetic study of silane-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by alkaline coprecipitation. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 75, p. 203-211, 2016.

MOBASSER, S.; FIROOZI, A.A. Review of Nanotechnology Applications in Science and Engineering. *J Civ Engin Urban*, v. 6, p. 84-93, 2016.

MOHAMED, B. M.; VERMA, N.K.; PRINA-MELLO, A.; WILLIAMS, Y.; DAVIES, A.M.; BAKOS, G.; TORMEY, L.; EDWARDS, C.; HANRAHAN, J.; SALVATI, A.; LYNCH, I.; DAWSON, K.; KELLEHER, D.; VOLKOV, Y. Activation of stress-related signalling pathway in human cells upon SiO₂ nanoparticles exposure as an early indicator of cytotoxicity. *J Nanobiotechnology*, v. 9, p. 29, 2011.

MOHAMMADINEJAD, R.; MOOSAVI, M.A.; TAVAKOL, S.; VARDAR, D.O.; HOSSEINI, A.; RAHMATI, M.; DINI, L.; HUSSAIN, S.; MANDEGARY, A.; KLIONSKY, D.J. Necrotic, apoptotic and autophagic cell fates triggered by nanoparticles. *Autophagy*, v.15, p4-33, 2019.

MUSAZZI, U.M.; MARINI, V.; CASIRAGHI, A.; MINGHETTI, P. Is the European regulatory framework sufficient to assure the safety of citizens using health products containing nanomaterials?. *Drug Discov Today*, v. 22, p. 870-882, 2017.

MYTYCH, J.; WNUK, M.; RATTAN, S.I. Low doses of nanodiamonds and silica nanoparticles have beneficial hormetic effects in normal human skin fibroblasts in culture. *Chemosphere*, v. 148, p. 307-315, 2016.

NASCARELLA, M.A.; CALABRESE, E.J. A method to evaluate hormesis in nanoparticle dose-responses. *Dose Response*, v. 10, p. 344-354, 2012.

NATH ROY, D.; GOSWAMI, R.; PAL, A. Nanomaterial and toxicity: what can proteomics tell us about the nanotoxicology? *Xenobiotica*, v. 47, n. 7, p. 632-643, 2017.

OECD.Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests No. 129, 2010. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd129.pdf>

PAN, Y.; LEIFERT, A.; RUAU, D.; NEUSS, S.; BORNEMANN, J.; SCHMID, G.; BRANDAU, W.; SIMON, U.; JAHNEN-DECHENT, W. Gold nanoparticles of diameter 1.4 nm trigger necrosis by oxidative stress and mitochondrial damage. *Small*, v. 5, p. 2067-2076, 2009.

PAN, Y.; BARTNECK, M.; JAHNEN-DECHENT, W. Cytotoxicity of gold nanoparticles. *Methods Enzymol*, v. 509, p. 225-42, 2012.

PARK, J.-H.; JEONG, H.; HONG, J.; CHANG, M.; KIM, M.; CHUCK, R.S.; LEE, J.K.; PARK, C.-Y. The Effect of Silica Nanoparticles on Human Corneal Epithelial Cells. *Sci Rep*, v. 6, 2016.

PATEL, S.; NANDA, R.; SAHOO, S. Nanotechnology in Healthcare: Applications and Challenges. *Medicinal chemistry*, v. 05, n. 12, p. 528–533, 2015.

PEDERZOLI, F.; TOSI, G.; VANDELLI, M.A.; BELLETTI, D.; FORNI, F.; RUOZI, B. Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on?. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, v.9, 2017.

PRIETO, P.; COLE, T.; CURREN, R.; GIBSON, R.M.; LIEBSCH, M.; RAABE, H.; TUOMAINEN, A.M.; WHELAN, M.; KINSNER-OVASKAINEN, A. Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50 > 2000 mg/kg): Results of an ECVAM validation study. *Regul Toxicol Pharmacol*, v. 65, p. 344-365, 2013.

RAHMAN, M.; LAURENT, S.; TAWIL, N.; YAHIA, L.H.L.H. Nanoparticle and Protein Corona In: *Protein-Nanoparticle Interactions*. Springer Series in Biophys, 15, p.21-44, 2013.

RAMOS, A. P.; CRUZ, M.A.E.; TOVANI, C.B.; CIANCAGLINI, P. Biomedical applications of nanotechnology. *Biophysical Reviews*, v. 9, n. 2, p. 79–89, 2017.

RANMADUGALA, D.; EBRAHIMINEZHAD, A.; MANLEY-HARRIS, M.; GHASEMI, Y.; BERENJIAN, A. Magnetic immobilization of bacteria using iron oxide nanoparticles. *Biotechnol Lett*, v. 40, p. 237-248, 2018.

RASMUSSEN, M.K.; KARDJILOV, N.; OLIVEIRA, C.L.P.; WATTS, B.; VILLANOVA, J.; BOTOSSO, V.F.; SANT'ANNA, O.A.; FANTINI, M.C.A.; BORDALLO, H.N. 3D visualisation of hepatitis B vaccine in the oral delivery vehicle SBA-15. *Sci Rep*, v.9, 2019.

REES, P.; WILLS, J.W.; BROWN, M.R.; BARNES, C.M.; SUMMERS, H.D. The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells. *Nature comm*, v. 10, 2019.

RIETSCHER, R.; THUM, C.; LEHR, C.M.; SCHNEIDER, M. Semi-Automated Nanoprecipitation-System—An Option for Operator Independent, Scalable and Size Adjustable Nanoparticle Synthesis. *Pharm Res*, v. 32, p. 1859-1863, 2015.

ROSA, R.G.T.; DUARTE, C.A.; SCHREINER, W.H.; MATTOSO-FILHO, N.P.; BEZERRA JR, A.G.; BARISON, A.; OCAMPOS, F.M.M. Structural, morphological and optical properties of Bi NPs obtained by laser ablation and their selective detection of L-cysteine. *Colloids Surf Phys Chem Eng Aspects A*, v. 457, p. 368-

373, 2014.

SABELLA, S.; CARNEY, R.P.; BRUNETTI, V.; MALVINDI, M.A.; AL-JUFFALO, N.; VECCHIO, G.; JANES, S.M.; BAKR, O.M.; CINGOLANI, R.; STELLACCI, F.; POMPA, P.P. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, v.6, 2014.

SAHA, M. Nanomedicine: promising tiny machine for the healthcare in future-a review. *Oman Med J*, v. 24, n. 4, p. 242-7, 2009.

SCANU, M.; MANCUSO, L.; CAO, G. Evaluation of the use of human Mesenchymal Stem Cells for acute toxicity tests. *Toxicol In Vitro*, v. 25, n. 8, p. 1989-95, 2011.

SCHÜTZ, I.; LOPEZ-HERNANDEZ, T.; GAO, Q.; PUCHKOV, D.; JABS, S.; NORDMEYER, D.; SCHMUDDE, M.; RUHL, E.; GRAF, C.M.; HAUCKE, V. Lysosomal Dysfunction Caused by Cellular Accumulation of Silica Nanoparticles. *J Biol Chem*, v. 291, n. 27, p. 14170-14184, 2016.

SEABRA, A. B.; PASQUÔTO, T.; FERRARINI, A.C.; SANTOS M.C.; HADDAD, P.S.; DE LIMA, R. Preparation, characterization, cytotoxicity, and genotoxicity evaluations of thiolated- and s-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: implications for cancer treatment. *Chem Res Toxicol*, v. 27, n. 7, p. 1207-18, 2014.

SENUT, M.C.; ZHANG, Y.; LIU, F.; SEN, A.; RUDEN, D.M.; MAO, G. Size-Dependent Toxicity of Gold Nanoparticles on Human Embryonic Stem Cells and Their Neural Derivatives. *Small*, v. 12, p. 631-646, 2016.

SILVA, M.F.; PINEDA, E.A.G.; BERGAMASCO, R. Aplicação de Óxidos de Ferro nanoestruturados como adsorventes e fotocatalisadores na remoção de poluentes de águas residuais. *Quim Nova*, v. 38, n. 3, p. 393-398, 2015.

SINGH, N.A. Nanotechnology innovations, industrial applications and patents. *Environ Chem Lett*, v.15, p. 185-191, 2017.

SOENEN, S. J.; HIMMELREICH, U.; NUYTTEN, N.; DE CUYPER, M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, v. 32, n. 1, p. 195–205, 2011.

STAEDLER, D.; PASSEMARD, S.; MAGOUROUX, T.; ROGOV, A.; MAQUIRE, C.M.; MOHAMED, B.M.; SCHWUNG, S.; RYTZ, D.; JUSTEL, T.; HWU, S.; MUGNIER, Y.; LE DANTEC, R.; VOLKOV, Y.; GERBER-LEMAIRE, S.; PRINAMELLO, A.; BONACINA, L.; WOLF, J.P. Cellular uptake and biocompatibility of bismuth ferrite harmonic advanced nanoparticles. *Nanomedicine*, v. 11, n. 4, p. 815-24, 2015.

STEWART, C.; KONSTANTINOV, K.; MCKINNON, S.; GUATELLI, S.; LERCH, M.; ROSENFELD, A.; TEHEI, M.; CORDE, S. First proof of bismuth oxide nanoparticles as efficient radiosensitisers on highly radioresistant cancer cells. *Phys Med*, v. 32, n.11, p. 1444-1452, 2016.

STOCCORO, A.; BUCCHIANICO, S.; UBOLDI, C.; COPPEDE, F.; PONTI, J.; PLACIDI, C.; BLOSI, M.; ORTELLI, S.; COSTA, A.L.; MIGLIORE, L. A panel of in vitro tests to evaluate genotoxic and morphological neoplastic transformation

potential on Balb/3T3 cells by pristine and remediated titania and zirconia nanoparticles. *Mutagenesis*, v. 31, n. 5, p. 511-29, 2016.

STOKES, W.S.; CASATI, S.; STRICKLAND, J.; PARIS, M. Neutral Red Uptake Cytotoxicity Tests for Estimating Starting Doses for Acute Oral Toxicity Tests. *Curr Protoc Toxicol*, cap. 20, 2008.

SWY, E. R.; SCHWARTZ-DUVAL, A.S.; SHUBONI, D.D.; LATOURETTE, M.T.; MALLET, C.L.; PARYS, M.; CORMODE, D.P.; SHAPIRO, E.M. Dual-modality, fluorescent, PLGA encapsulated bismuth nanoparticles for molecular and cellular fluorescence imaging and computed tomography. *Nanoscale*, v. 6, n. 21, p. 13104-12, 2014.

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2019. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/cpi/search-products/?title=bismuth>.

THORNE, D.; KLIFORD, J.; PAYNE, R.; HASWELL, L.; DALRYMPLE, A.; MEREDITH, C.; DILON, D. Development of a BALB/c 3T3 neutral red uptake cytotoxicity test using a mainstream cigarette smoke exposure system. *BMC Res Notes*, v. 7, p. 367, 2014.

TREUEL, L.; DOCTER, D.; MASKOS, M.; STAUBER, R.H. Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol*, v. 6, p. 857-73, 2015.

U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE, 2019. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 18/07/2019.

UBOLDI, C.; URBAN, P.; GILLILAND, D.; BAIK, E.; VALSAMI-JONES, E.; PONTI, J.; ROSSI, F. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, v. 31, p. 137-45, 2016.

UBOLDI, C.; GIUDETTI, G.; BROGGI, F.; GILLILAND, D.; PONTI, J.; ROSSI, F. Amorphous silica nanoparticles do not induce cytotoxicity, cell transformation or genotoxicity in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutat Res*, v. 745, p. 11-20, 2012.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 9, p. 726-36, 2008.

UN (United Nations). Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS) Forth Revised Edition, 2011. Disponível em: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf.

VALDIGLESIAS, V.; FERNANDEZ-BERTELEZ, N.; KILIÇ, G.; COSTA, C.; COSTA, S.; FRAGA, S.; BESSA, M.J.; PÁSARO, E.; TEIXEIRA, J.P.; LAFFON, B. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *J Trace Elem Med Biol*, v.38, p. 53-63, 2016.

VANCE, M.E. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol*, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; LUENGO, Y.; SERNA, C.J.; ANDRÉS-VERGÉS, M.; VARELA, M.; CALERO, M.; LAZARO-CARRILLO, A.;

VILLANUEVA, A.; SISNIEGA, A.; MONTESINOS, P.; MORALES, M.P. Bismuth labeling for the CT assessment of local administration of magnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 26, n. 13, p. 135101, 2015.

VEJUX, A.; KAHN, E.; MÉNÉTRIER, F.; MONTANGE, T.; LHEMINIER, J.; RIEDINGER, J.M.; LIZARD, G. Cytotoxic oxysterols induce caspase-independent myelin figure formation and caspase-dependent polar lipid accumulation. *Histochem Cell Biol*, v. 127, n. 6, p. 609-24, 2007.

VENDITTO, V.J.; SZORKA JR, F.C. Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs!. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 65, p. 80-88, 2013.

WALUM, E. Acute Oral Toxicity. *Environ Health Perspect*, v. 106, suppl. 2, 1998.

WANG, F.; GAO, F.; LAN, M.; YUAN, H.; HUANG, Y.; LIU, J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicol In Vitro*, v. 23, n. 5, p. 808-15, 2009.

WANG, Y.; ZHU, M.T.; WANG, B.; WANG, M.; WANG, H.J.; OUYANG, H.; FENG, W.Y. In vitro cytotoxicity of transparent yellow iron oxide nanoparticles on human glioma cells. *J Nanosci Nanotechnol*, v. 10, p. 8550-8555, 2010.

WANG, Y.; WU, S.; ZHAO, X.; SU, Z.; DU, L.; SUI, A. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells. *Biomed Mater Eng*, v. 24, p. 2007-2013, 2014.

WATANABE, E.; MUENZER, J.T.; HAWKINS, W.G.; DAVIS, C.G.; DIXON, D.J.; MCDUNN, J.E.; BRACKETT, D.J.; LERNER, M.R.; SWANSON, P.E.; HOTCHKISS, R.S. Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study. *Lab Invest*, v. 89, p. 549-61, 2009.

WLODKOWIC, D.; TELFORD, W.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods Cell Biol*, v. 103, p. 55-98, 2011.

WOLFRAM, F. Safety of nanoparticles in medicine. *Curr Drug Targets*, v. 16, p. 1671-1681, 2015.

XIE, G.; SUN, J.; ZHONG, G.; SHI, L.; ZHANG, D. Biodistribution and toxicity of intravenously administered silica nanoparticles in mice. *Arch Toxicol*, v. 84, p. 183-190, 2010.

YAN, X.; YANG, W.; SHAO, Z.; YANG, S.; LIU, X. Triggering of apoptosis in osteosarcoma cells by graphene/single-walled carbon nanotube hybrids via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *J Biomed Mater Res A*, v. 105, p. 443-453, 2017.

YANES, R.E.; TAM, D.; HWANG, A.A.; FERRIS, D.P.; SHERMAN, S.P.; THOMAS, C.R.; LU, J.; PYLE, A.D.; ZINK, J.I.; TAMANOI, F. Involvement of Lysosomal Exocytosis in the Excretion of Mesoporous Silica Nanoparticles and Enhancement of the Drug Delivery Effect by Exocytosis Inhibition. *Small J*, v. 9, n.5, p. 697-704, 2013.

ZHANG, S.; GAO, H.; BAO, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular

Endocytosis, v. 9, p. 8655-8671, 2015.

ZHANG, X. Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. Cell Biochem Biophys, v. 72, p. 771-775, 2015.

ZHAO, X.; HILLIARD, L.R.; MECHERY, S.J.; WANG, Y.; BAGWE, R.P.; JIN, S.; TAN, W. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, p. 15027-15032, 2004.

ZHENG, X.; BAKER, H.; HANCOCK, W.S.; FAWAZ, F.; MCCAMAN, M.; PUNGOR JR, E. Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs. Biotechnol Prog, v. 22, p. 1294-1300, 2006.

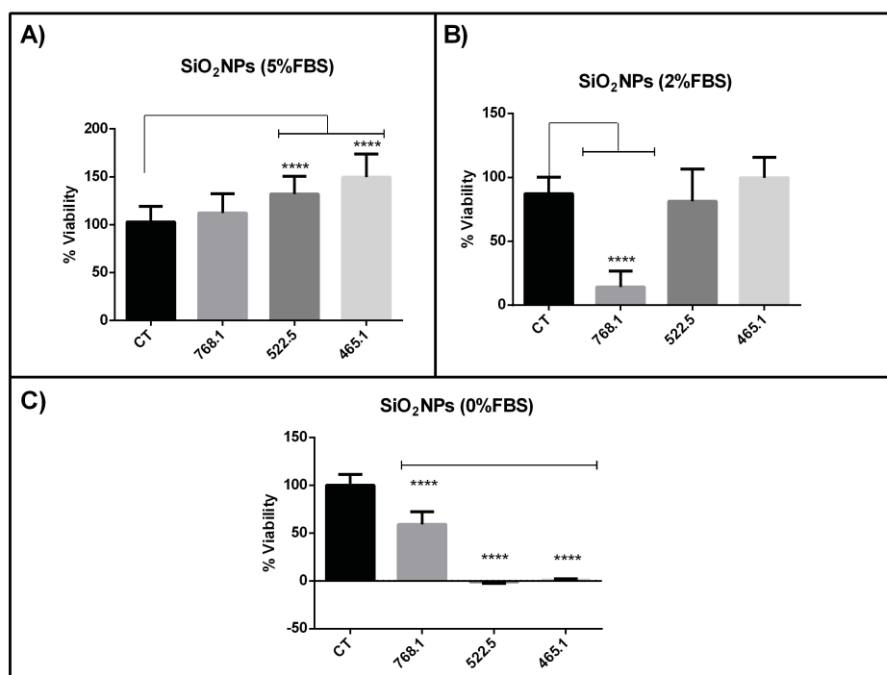
ZORODDU, M.A.; MEDICI, S.; LEDDA, A.; NURCHI, V.M.; LACHOWICZ, J.I.; PEANA, M. Toxicity of nanoparticles. Curr Med Chem, v. 21, p. 3837-3853, 2014.

12 APÊNDICE 1 – Resultados adicionais: SiO₂NPs

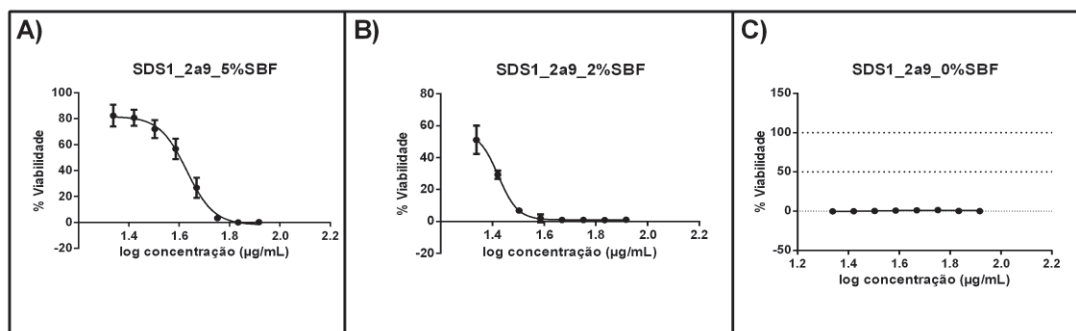
Uma vez observado um aumento na viabilidade celular relativa das células BALB/c 3T3 frente ao tratamento com SiO₂NPs, fenômeno descrito como hormese (MATTSON, 2008), prosseguiu-se com uma avaliação adicional deste fenômeno. Durante as avaliações, seguimos a OECD *Guideline* 129 e utilizamos 5% de soro bovino fetal (SBF) para o cultivo celular. Portanto, em um segundo momento, nós buscamos investigar se este mesmo fenômeno seria observado em condições com redução de SBF (2% e 0%). Se positivo, este resultado poderia abrir um leque de novas possibilidades, uma vez que para a indústria, a redução de SBF nos cultivos celulares sem comprometer a viabilidade celular representa um ganho muito importante tanto do ponto de vista ético (redução do uso de matérias-primas de origem animal), quanto monetário (redução significativa de custos). Sendo assim, experimentos utilizando as mesmas concentrações de SiO₂NPs que levaram ao aumento da viabilidade celular relativa nos cultivos com 5% SBF (465,1 µg/ml, 522,5 µg/ml e 768,1 µg/ml) foram conduzidos, porém na presença de 2% e 0% de SBF (Apêndice 1 - Figura 1).

Através da redução do SBF, não foi mais observado o aumento da viabilidade celular relativa e, inclusive, nestas mesmas concentrações as SiO₂NPs levaram a redução da viabilidade celular (Apêndice 1 - Figura 1B e 1C). Em um primeiro momento, a hipótese levantada foi de que poderia haver algum comprometimento na corona destas NPs com a redução do SBF, uma vez que quanto menor a concentração de SBF, maior foi a toxicidade gerada às células. Porém, antes de investigar a corona ou mesmo processos mais complexos, nós buscamos avaliar a resposta das células BALB/c 3T3 frente a exposição a outra droga na redução de SBF. Para tanto, foi utilizado o SDS, o controle positivo empregado em todos os outros experimentos de viabilidade, com um perfil bastante característico e com um histórico ao longo dos ensaios (Apêndice 1 - Figura 2). Neste caso, foi observado que na redução de SBF, a exposição ao SDS levou a uma redução drástica na viabilidade celular relativa em concentrações que não se observava morte celular (Apêndice 1 - Figura 2). Isso demonstra que a redução da viabilidade celular relativa na redução de SBF e exposição a SiO₂NPs ocorre devido a uma resposta inerente às células BALB/c 3T3, as quais se tornam mais fragilizadas na redução do SBF. Em 1994, Kulkarni

e McCulloch demonstraram que simplesmente a privação de soro induz a morte celular apoptótica em células BALB/c 3T3. Mannerström e colaboradores (2016) mencionam em seu trabalho que para BALB/c 3T3, a concentração de soro mínima para a sobrevivência da célula é de 5%, justificando e corroborando nossos achados. Portanto, à medida que ocorre a redução do SBF, as células se tornam mais fragilizadas e morrem; fenômeno que não se relaciona portanto às SiO₂NPs.



Apêndice 1 - Figura 1: SiO₂NPs levam a um aumento na viabilidade celular relativa (hormese) em células BALB/c 3T3 apenas na presença de 5% de SBF. SiO₂NPs tiveram sua citotoxicidade avaliada por vermelho neutro. Células murinas Balb/c 3T3 foram tratadas durante 48 horas com diferentes diluições de SiO₂NPs e então incubadas com a solução de vermelho neutro por 3 horas. Uma curva dose-resposta foi obtida para cada experimento. A) Citotoxicidade de SiO₂NPs cultivadas na presença de 5% SBF (n=3) demonstrada através de gráfico de barras (ANOVA de uma via de múltiplas comparações com pós-teste de Dunnet; B) Citotoxicidade de SiO₂NPs cultivadas na presença de 2% SBF (n=3) demonstrada através de gráfico de barras (ANOVA de uma via de múltiplas comparações com pós-teste de Dunnet; C) Citotoxicidade de SiO₂NPs cultivadas na presença de 0% SBF (n=3) demonstrada através de gráfico de barras (ANOVA de uma via de múltiplas comparações com pós teste de Dunnet. Legenda: ****: p<0.001.



Apêndice 1 - Figura 2: SDS causa redução de viabilidade celular relativa em concentrações atóxicas quando em condições com redução de SBF. A) Citotoxicidade de SDS na presença de 5% SBF; B) Citotoxicidade de SDS na presença de 2% SBF; C) Citotoxicidade de SDS na presença de 0% SBF.